









L-PANTOLACTONE-HYDROLASE AND A METHOD FOR PRODUCING D-PANTOLACTONE

Patent number: WO0132890
Publication date: 2001-05-10
Inventor: KESSELER MARIA (DE); HAUER BERNHARD (DE);
FRIEDRICH THOMAS (DE); MATTES RALF (DE)
Applicant: BASF AG (DE); KESSELER MARIA (DE); HAUER
BERNHARD (DE); FRIEDRICH THOMAS (DE);
MATTES RALF (DE)
Classification:
- international: C12N15/55; C12N9/18; C12N1/21; C12P17/04;
C12P41/00; C12N1/21; C12R1/19
- european: C12N9/18; C12P17/04; C12P41/00C4
Application number: WO2000EP10320 20001020
Priority number(s): DE19991052501 19991029; DE20001029194 20000619

Also published as:

 EP1224296 (A1)
 EE200200225 (A)
 CA2389064 (A1)

Cited documents:

 EP0794251
 EP0504421
 WO0028043
 XP002161908
 JP55072182
more >>

Report a data error here

Abstract of WO0132890

The invention relates to proteins which have an enzymatic activity for hydrolysing L-pantolactone. The invention also relates to nucleic acids that code for these proteins, to nucleic acid constructs, to vectors, to genetically modified micro-organisms and to a method for producing D-pantolactone.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. Mai 2001 (10.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/32890 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/55,
9/18, 1/21, C12P 17/04, 41/00 // (C12N 1/21, C12R 1:19)

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGE-
SELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/10320

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. Oktober 2000 (20.10.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 52 501.3 29. Oktober 1999 (29.10.1999) DE
100 29 194.5 19. Juni 2000 (19.06.2000) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): KESSELER, Maria [DE/DE]; J 6,6, 68159 Mannheim (DE). HAUER, Bernhard [DE/DE]; Merowingerstr. 1, 67136 Fussgönheim (DE). FRIEDRICH, Thomas [DE/DE]; Saalbastr. 22-24, 64283 Darmstadt (DE). MATTES, Ralf [DE/DE]; Friedrich-Zundel-Str. 14, 70619 Stuttgart (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/32890 A1

(54) Title: L-PANTOLACTONE-HYDROLASE AND A METHOD FOR PRODUCING D-PANTOLACTONE

(54) Bezeichnung: L-PANTOLACTON-HYDROLASE UND EIN VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON D-PANTOLACTON

(57) Abstract: The invention relates to proteins which have an enzymatic activity for hydrolysing L-pantolactone. The invention also relates to nucleic acids that code for these proteins, to nucleic acid constructs, to vectors, to genetically modified micro-organisms and to a method for producing D-pantolactone.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Proteine, die eine enzymatische Aktivität zur Hydrolyse von L-Pantolacton aufweisen. Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäuren, die für diese Proteine codieren, Nucleinsäurekonstrukte, Vektoren, genetisch veränderte Mikroorganismen sowie ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantolacton.

L-Pantolacton-Hydrolase und ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantolacton

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Proteine, die eine enzymatische Aktivität zur Hydrolyse von L-Pantolacton aufweisen. Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäuren, die
10 für diese Proteine codieren, Nucleinsäurekonstrukte, Vektoren, genetisch veränderte Mikroorganismen sowie ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantolacton.

D-Pantolacton ist eine Vorstufe in der chemischen Synthese bzw.
15 Biosynthese von Pantothersäure, Panthenol und Pantothecin und deren Derivate. Diese werden als Vitaminzusätze in der menschlichen Ernährung, im Tierfutter, in der Medizin beispielsweise für die Wundheilung und in der Kosmetik beispielsweise in der Haarkosmetik eingesetzt. Wirtschaftliche Verfahren zur Synthese
20 von enantiomerenreinem D-Pantolacton sind daher von großer Bedeutung. Neben den seit langem ausgeübten chemischen Verfahren zur Herstellung von D-Pantolacton wurden in jüngerer Zeit auch verschiedene biotechnologische Verfahren bearbeitet. Eine Übersicht über Pantolacton und seine chemische Synthese ist Ullmann's
25 Encyclopedia of Industrial Chemistry (Vol. A27, 1996, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 69451 Weinheim, Seite 559-566) zu entnehmen.

Für die biotechnologische Synthese von Pantolacton wurden ver-
30 schiedenen Synthesestrategien verfolgt.

Eine Racematspaltung durch selektive Hydrolyse von O-Acetyl-Pantolacton mittels Lipasen oder Esterasen wird von Glänzer et al. (1988, Enzyme Microb. Technol. 10, 689-690) beschrieben.
35 Eine derartige Racematspaltung wird in den Schutzrechten DE 40 05 150 und EP-A-0 507 278 beansprucht. Die erreichbare Enantiomerenreinheit ist für eine technische Nutzung bei diesem Verfahren ungenügend.

40 Von Degussa wird die Herstellung von Pantolacton mit dem Enzym Oxinitrilase ausgehend von Hydroxypivalaldehyd und Blausäure über optisch reines Hydroxypivalaldehydcyanhydrin beschrieben (DE 41 26 580, EP-A-0 528 256, DE 41 39 987). In dieser Reaktion sind theoretisch 100 % Ausbeute zu erreichen. Nach-
45 teil dieser Reaktion ist der hohe Enzymbedarf (äquimolare Mengen

Enzym:Substrat) sowie die relativ geringe Enantiomerenreinheit des Produkts (max. 82 % ee).

In JP 47019745 wird die Synthese von D-Pantolacton mit Hilfe
5 von *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Bacillus* oder *Corynebacterium* beschrieben. In der Reaktion setzen die genannten Organismen racemisches Pantolacton zu D-Pantolacton um, in dem sie das L-Pantolacton verstoffwechseln. Nachteil dieses Verfahren ist, daß die Hälfte des Edukts verstoffwechselt wird und damit ver-
10 loren ist.

Mitsubishi Chemical Ind. und Ube Ind. haben Verfahren zur Herstellung von D-Pantolacton aus D,L-Pantolacton beansprucht (JP 6067320, JP 62294092, JP 62294096, JP 57152895). In
15 diesen Verfahren werden L-Pantolacton-Hydrolasen aus den Hefen *Rhodothorula*, *Sporidiobolus* und *Sterigmatomyces* beschrieben. Aus heutiger Sicht (siehe Yamada & Shimizu, Ann.N.Y.Acad.Sci. 672 [1992] in *Enzyme Eng.* XI, Clark et al., 372-386; *Chimia*, 47, 1993: 5-10, JP 62187426; JP 61293384; JP 61293386; *Angew. Chem.*
20 *Int. Ed. Engl.* 27, 1988: 622-642, *Chemical Aspects of Enzyme Biotechnology*, eds. T.O. Baldwin et al., Plenum Press, New York, 1990: 151-163) bestätigt durch eigene Arbeiten scheint die direkte Hydrolyse des L-Pantolactons in diesen Hefen jedoch zweifelhaft. Die Reaktion verläuft vielmehr über das Ketopanto-
25 lacton, das durch die Ketopantoat-Oxidoreduktasen zum L-Pantolacton umgesetzt wird. In eigenen Arbeiten konnte das Ketopantolacton als Zwischenstufe nachgewiesen werden, das heißt es erfolgt keine direkte Hydrolyse zum L-Pantolacton. Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Pantolacton-Konzentration, die im Ver-
30 fahren umgesetzt werden kann.

Diese Reaktion über Ketopantolacton- und Ketopantoat-Oxidoreduktasen wurde auch für Bakterien beschrieben (z.B. Yamada & Shimizu, s.o.; Shimizu et al., 1988, *J. Biol. Chem.* 263, 12077-12084, Kataoka et al. 1992, *Eur. J. Biochem.* 204, 799-806).
35 Entsprechende Verfahren zur enantioselektiven Synthese von D-Pantolacton aus D,L-Pantolacton via Ketopantolacton und Ketopantoat haben zwar den Vorteil einer hohen Ausbeute (theoretisch 100 %, 90,5 % erreicht mit *Rhodococcus* s.u.), sind jedoch wegen
40 des Cofaktorbedarfs (NADH oder NADPH), der Zufütterung eines Energiesubstrates (Glucose), der niedrigen Raum-Zeit-Ausbeute und der geringen Endkonzentrationen (18,2-72 g/l D-Pantolacton) nicht wirtschaftlich. Desweiteren ist ein solches Verfahren dadurch benachteiligt, daß die beiden beteiligten Enzyme i.d.R.
45 verschiedene Optima für die Umsatzbedingungen aufweisen, ein Problem, das bei Verwendung eines einzigen (hydrolytischen) Enzyms entfällt.

- Die Firma Fuji in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Yamada an der Kyoto Universität hat ein Verfahren zur enzymatischen Racematspaltung mit Hilfe einer pilzlichen D-Pantolacton-Hydrolase (JP 09308-497, JP 11056356, EP-B-0 436 730, EP-B-0 504 421, EP-A-0 794 251, WO 92/06182, WO 97/10341, US 5,275,949, US 5,372,940) entwickelt. Das Enzym läßt sich beispielsweise aus den Pilzen *Cylindrocarpon tonkinense*, *Gibberella fujikuroi* und *Fusarium oxysporum* isolieren. Die D-Pantolacton-Hydrolase ist ein glycosyliertes Enzym, das aus einem 125 kDa Homodimer besteht und Ca^{2+} -abhängig ist (Ann. N.Y. Acad. Sci. 1996, 799: 650-658, Enzyme Engineering). Das Enzym wird durch Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} und EDTA inhibiert (US 5,372,940). Die Reinigung der D-Pantolacton-Hydrolase wurde von Shimizu et al. beschrieben. Das gereinigte Enzym zeigt gegenüber einer Reihe von Lactonen speziell gegenüber Zuckerlactonen eine Hydrolaseaktivität (Eur. J. Biochem., 209, 1992: 383-390). Seine Sequenz zeigt schwache Homologien zur Gluconolactonase aus *Zymomonas mobilis* (28,9 %), der humanen und Ratten-Paraoxonase (25,3 %) und der Strictosidin Synthase aus *Catharanthus roseus* (15,9 %; EP-A-0 794 251, Kobayashi et al. 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 12787-12792). Von Kataoko et al. wird eine starke Abhängigkeit der erzielten Enantiomerenreinheit des Produkts vom Umsatz bei unterschiedlichen pH-Werten (Enzym. Microbiol. Technol. 19: 307-310, 1996 und Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995, 44: 333-338) beschrieben. Bei pH-Werten, die nahe oder über pH 7 liegen, werden geringere Enantiomerenreinheiten erzielt, da die spontane chemische Hydrolyse des L-Pantolactons bei höheren pH-Werten immer stärker wird und so die Enantiomerenreinheit des Produkts herabsetzt. Als optimaler pH-Wert für die Herstellung möglichst enantiomerenreinen D-Pantolactons wird pH 5 angegeben. Die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms ist bei diesem pH jedoch erheblich verlangsamt. Um optisch reines Produkt zu erhalten, ist nach Extraktion eine anschließende Kristallisation erforderlich (Yamada, H. Chimia 47, 1993: 5-10).
- Von Nachteil bei den oben genannten Prozessen ist, daß sie häufig nur zu Produkten mit einer geringen optischen Reinheit führen und/oder daß sie nur mit geringen Raum-Zeit-Ausbeuten ablaufen. Dies führt zu wirtschaftlich unattraktiven Prozessen. Nach wie vor besteht deshalb ein großer Bedarf nach einem einfachen, wirtschaftlichen biotechnologischen Verfahren zur Herstellung von D-Pantolacton, das die oben genannten Nachteile nicht aufweist. Dieses Verfahren sollte ausgehend von der bestehenden chemischen Synthese einen einfachen Zugang zu D-Pantolacton in hohen Ausbeuten und Enantiomerenreinheiten ermöglichen, so daß keine weitere Aufreinigung des Produkts mehr erforderlich ist.

Es bestand daher die Aufgabe, ein einfaches, wirtschaftliches Verfahren zur Herstellung von D-Pantolacton zur Verfügung zu stellen. Diese Aufgabe wurde durch eine isolierte Nukleinsäuresequenz gelöst, die für ein Polypeptid mit L-Pantolacton-Hydrolaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
- 10 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist
- 15
- 20 d) funktionelle Äquivalente der unter (a) bis (c) genannten Sequenzen.

Diese L-Pantolacton-Hydrolasen lassen sich in Organismen vorteilhaft Mikroorganismen wie Bakterien finden. Das Enzym bzw. die Enzyme besitzen eine hohe enzymatische Aktivität zur hydrolytischen Umwandlung von L-Pantolacton in L-Pantoinsäure.

Diese L-Pantolacton-Hydrolasen setzen D-Pantolacton nicht um, so daß die Organismen, Extrakte oder gereinigte Enzyme sowie entsprechende rekombinante Stämme bzw. Proteine zur Herstellung von enantiomerenreinem D-Pantolacton verwendet werden können.

Unter Derivaten der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 sind beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 50 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, bevorzugt mindestens 60 % Homologie, besonders bevorzugt 70 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 80 % Homologie aufweisen. Die Homologie wurde entweder nach der Methode von Needleman & Wunsch (J. Mol. Biol. 48, 1970: 443-453) oder Smith & Waterman (Adv. Appl. Math., 2, 1981: 482-489) bestimmt. Über Teilbereiche der Sequenzen können die Homologien vorteilhaft höher liegen. Die von SEQ ID NO: 1 abgeleitete Aminosäuresequenz ist SEQ ID NO: 2 zu entnehmen. Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die enzymatische

Aktivität der abgeleiteten synthetisierten Proteine nicht wesentlich reduziert sein sollte. Unter Enzymen mit einer nicht wesentlich reduzierten enzymatischen Aktivität sind Enzyme zu verstehen, die eine enzymatische Aktivität von mindestens 20 %, bevorzugt 50 %, besonders bevorzugt 75 %, ganz besonders bevorzugt 90 % aufweisen. Die Erfindung betrifft damit auch Aminosäuresequenzen, die durch die oben dargestellte Gruppe von Nukleinsäuresequenzen kodiert werden. Vorteilhaft betrifft die Erfindung Aminosäuresequenzen, die durch die Sequenz SEQ ID NO: 1 kodiert werden.

Unter funktionellen Äquivalenten der unter (a) bis (c) genannten Sequenzen sind Nukleinsäuren zu verstehen, die für Enzyme kodieren, die L-Pantolacton zur entsprechenden Säure hydrolysieren und die mindestens 20 %, bevorzugt 50 %, besonders bevorzugt 75 %, ganz besonders bevorzugt 90 % der Aktivität der unter SEQ ID NO: 2 genannten Sequenz aufweisen, nicht durch EDTA (1 mM-Lösung) gehemmt werden und zwischen pH 4 bis 10 stabil sind. Diese funktionellen Äquivalente weisen außerdem vorteilhaft ein pH-Optimum zwischen pH 7 und 8 auf und ein Temperaturoptimum zwischen 70°C und 80°C.

Weiterhin sind unter Derivate auch Homologe der SEQ ID NO: 1 beispielsweise pilzliche oder bakterielle Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der codierenden und nicht-codierenden DNA-Sequenz zu verstehen. Homologe der SEQ ID NO: 1 besitzen auf DNA-Ebene eine Homologie von mindestens 50 %, bevorzugt von mindestens 60 %, besonders bevorzugt von mindestens 70 %, ganz besonders bevorzugt von mindestens 80 % über den gesamten in SEQ ID NO: 1 angegebenen DNA-Bereich.

Außerdem sind unter Homologe der SEQ ID NO: 1 Derivate wie beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Die Promotoren, die den angegebenen Nukleotidsequenzen vorgeschaltet sind, können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.

Unter Derivaten sind auch Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz im Bereich von -1 bis -200 vor dem Startcodon oder 0 bis 1000 Basenpaare nach dem Stopcodon so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression verändert, bevorzugt erhöht wird.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen lassen sich prinzipiell aus allen Organismen identifizieren und isolieren. Vorteilhaft läßt sich die SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen aus Pilzen, Hefen oder Bakterien isolieren. Als Bakterien seien gram-
5 negative und gram-positive Bakterien genannt. Bevorzugt werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäure(n) [der Plural und Singular sollen für die Anmeldung gleichbedeutend sein] aus gram-negativen Bakterien vorteilhaft aus α -Proteobakterien, β -Proteobakterien oder γ -Proteobakterien, besonders bevorzugt aus Bakterien der
10 Familien Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae oder Rhizobiaceae, ganz besonders bevorzugt aus Bakterien der Gattung Agrobacterium, Pseudomonas oder Burkholderia über dem Fachmann bekannte Methoden isoliert. Als vorteilhaft geeignete Pilze seien die Gattungen Beauveria oder Psilocybe genannt. Vorteilhafte Hefen sind bei-
15 spielsweise in der Gattung Apiotrichum zu finden.

SEQ ID No: 1 oder seine Derivate, Homologen oder Teile dieser Sequenzen lassen sich beispielsweise mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-Technik aus anderen Pilzen oder
20 Bakterien isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standardbedingungen mit den erfindungsgemäßen Sequenzen. Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide der konservierten Bereiche beispielsweise aus dem aktiven Zentrum, die über Vergleiche mit der D-Pantolacton-Hydrolase in dem Fach-
25 mann bekannter Weise ermittelt werden können (ein solcher Bereich ist beispielsweise das sog. HTGT-Motiv), verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure Oligonukleotid,
30 längeres Fragment oder vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart DNA oder RNA für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca. 10°C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.

35 Unter Standardbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 20 und 70°C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 X SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50 % Formamid. Vorteilhafterweise liegen die
40 Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 2,0 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C bis 70°C, bevorzugt zwischen etwa 50°C bis 70°C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 2,0 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C bis 60°C, bevorzugt zwischen etwa 35°C bis 60°C. Diese
45 angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 1000 Nukleotiden und einem G- + C-Gehalt von

- 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
- Unter dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukt sind die L-Pantolacton-Hydrolasegene mit Sequenz SEQ ID No: 1 und seine Derivate und Homologen zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen, an die Induktoren oder Repressoren binden, und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Nukleinsäurekonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Sequenz SEQ ID No: 1 oder seine Homologen inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird. Das Nukleinsäurekonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nucleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können in einer oder mehreren Kopien im Konstrukt enthalten sein. Im Konstrukt können noch weitere Marker wie Antibiotikaresistenzen oder Auxotrophien komplementierende Gene gegebenenfalls zur Selektion auf das Konstrukt enthalten sein.
- Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie aphII (Tn5)-, trc-, cos-, tac-, trp-, lacPAI, rha, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-

- lac-, lacI^q-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ -P_R- oder λ -P_L-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren wie in den konstitutiven oder induzierbaren Streptomyces-Promotoren aphI, ermE, melC, tipA, mcrAB, gylCAB, veg, SPO1, amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren AOX1, GAL1, ADC1, MF α , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH. In diesem Zusammenhang sind auch die Promotoren der Pyruvatdecarboxylase und der Methanoloxidase aus beispielsweise Hansenula vorteilhaft. Es können auch künstliche Promotoren für die Regulation verwendet werden.

- Das Nukleinsäurekonstrukt wird zur Expression in einem Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen Vektor wie beispielsweise einem Plasmid, einem Phagen oder sonstiger DNA inseriert, das eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Diese Vektoren stellen eine weitere Ausgestaltung der Erfindung dar. Geeignete Plasmide sind beispielsweise in E. coli pBluescript, pBAD, pQE (His-tag System), pICIC223-3, pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pGEM7Z, pKK223-3, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹¹³-B1, λ gt11 oder pBdCI oder broad-host-range Plasmide wie pBBR1MCS oder pRK293, in Streptomyces und anderen Actinomyceten pIJ101, pIJ364, pMVS301, pIJ702 oder pIJ361, in Bacillus PUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2 μ M, pAG-1, YEpl6, YEpl3 oder pEMBLYe23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHlac⁺, pBIN19, pAK2004 oder pDH51. Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P.H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden.

- Vorteilhafterweise enthält das Nukleinsäurekonstrukt zur Expression der weiteren enthaltenen Gene zusätzlich noch 3' und/oder 5' Terminale regulatorische Sequenzen zur Steigerung der Expression, die je nach ausgewähltem Wirtorganismus und Gen oder Genen für eine optimale Expression ausgewählt werden.
- Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

- Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der
- 5 Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.
- 10 In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann der das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt oder die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthaltende Vektor auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Mikroorganismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des
- 15 Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Vektor wie einem Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurekonstrukt oder der erfindungsgemäßen Nukleinsäure bestehen.
- 20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine L-Pantolacton-Hydrolase, gekennzeichnet durch die folgenden Eigenschaften:
- a) Umsetzung von L-Pantolacton zur entsprechenden Säure;
 - 25 b) pH-Stabilität: L-Pantolacton-Hydrolase ist stabil in einem pH-Bereich von 4 bis 10
 - c) pH-Optimum: 7,2 bis 7,6
 - 30 d) Temperaturoptimum: ca. 70°C bis 75°C
 - e) keine Hemmung der Aktivität durch EDTA
- Diese L-Pantolacton-Hydrolase kann im erfindungsgemäßen Verfahren
- 35 als freies oder immobilisiertes Enzym verwendet werden.
- Für eine optimale Expression heterologer Gene in Organismen ist es vorteilhaft die Nukleinsäuresequenzen entsprechend der im Organismus verwendeten spezifischen "codon usage" zu verändern.
- 40 Der "codon usage" läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.
- Die Expression der erfindungsgemäßen Gene und der von diesen
- 45 Genen kodierte Proteine in einem Wirtsorganismus beinhaltet in der Regel einen Streß für diese Organismen. Durch gleichzeitige Expression dieser Gene in Gegenwart mindestens eines Gens, das

- für ein sogenanntes Streßprotein kodiert oder in Gegenwart einer Kombination dieser Gene, können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren vorteilhaft in den erfindungsgemäßen Wirtsorganismen exprimiert werden. Streßproteine, auch Hitzeschockproteine
- 5 (= HSP) oder molekulare Chaperone (engl. Anstandsdame oder Gouvernante) genannt, gehören zu den in der Evolution sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten am besten konservierten Proteine und sind universell bei allen Organismen zu finden. Ihre Unterteilung erfolgt nach dem Molekulargewicht in Kilodalton, z.B. HSP60, 70,
- 10 90 usw. Diese Streßproteine verdanken ihre Bezeichnung ihrer Eigenschaft durch Streßbedingungen wie zu niedriger Glukosespiegel, Hitzeschock, Alkohol, UV-Licht, oxidative Reagenzien etc. induzierbar zu sein.
- 15 Viele Streßproteine und konstitutiv gebildete verwandte Proteine sind für die korrekte Faltung, Zusammenlagerung, Stabilisierung und den Transport von Proteinen essentiell. Durch die Koexpression der erfindungsgemäßen Proteine in Gegenwart mindestens eines Streßproteins können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren
- 20 vorteilhaft exprimiert werden. Eine gegebenenfalls vorkommende Proteinaggregation der Hydrolasen kann so vorteilhaft verhindert werden. Dabei binden die Streßproteine an hydrophobe Teile der Proteine und verhindern so eine falsche Faltung der Proteine bzw. ermöglichen die korrekte Faltung. Bereits aggregierte oder dena-
- 25 turisierte Proteine werden wieder dissoziiert und richtig gefaltet. Häufig treten diese Streßproteine bei der Ausübung ihrer Funktion in Kooperation mit anderen Proteinen sogenannten Helferproteinen (= cohort-Proteinen) man spricht deshalb von sogenannten Chaperon-Maschinen, die die vorteilhafte Wirkung bei der
- 30 Expression der erfindungsgemäßen Gene haben (Frydaman et al., Nature, 370, 1994: 111-117). Die Wirkung dieser Chaperon-Maschinen kann unter ATP-Verbrauch erfolgen (= "Hauptchaperon-Maschinen") oder ohne ATP-Verbrauch (= "Junior-Chaperone"). Vorteilhaft Chaperone oder Hitzeschockproteine sind beispielsweise
- 35 die eukaryontischen Gene HSP17,5, HSP22, HSP 25, HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, TRiC, UBI1,2,3,4 oder ihre prokaryontischen Homologen wie HtpG, DnaK, DnaJ, GroES, GroEL, HtrC, ClpB, GrpE etc. Bevorzugte Chaperone sind GroES, GroEL, HtpG, DnaK, DnaJ, HSP70 oder HSP27.
- 40
- Vorteilhaft werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in Gegenwart mindestens eines Streßproteins exprimiert, dabei können die Gene unter gemeinsamer Kontrolle eines Promoters liegen oder von getrennten Promotoren gelesen werden. Dementsprechend kann ihre
- 45 Expression durch Zugabe einer oder mehrerer Induktorsubstanzen gleichzeitig oder zu getrennten Zeitpunkten induziert werden. Die Nukleinsäuren können auf einem Vektor liegen oder auf getrennten

Vektoren. Es ist auch möglich die Streßproteine des Wirtsorganismus über eine genetische Manipulation so zu verändern, daß sie überexprimiert werden.

- 5 Auch alternative Methoden zur Erhöhung des nativen Enzymanteils wie die Anzucht der Mikroorganismen, die das erfindungsgemäße Protein synthetisieren, bei niedrigen Temperaturen oder die Renaturierung durch Anwendung hoher Drücke (vorteilhaft 1 bis 2 kbar) auf Suspensionen des erfindungsgemäßen Proteins (mit oder
10 ohne Zusatz denaturierender Agenzien, beispielsweise Guanidin-Hydrochlorid) können vorteilhaft sein.

- Als rekombinante Wirtsorganismen für die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder das Nukleinsäurekonstrukt kommen prinzipiell
15 alle prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen in Frage. Vorteilhafterweise werden als Wirtsorganismen Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze oder Hefen verwendet. Vorteilhaft werden gram-positive oder gram-negative Bakterien, bevorzugt Bakterien der Familien Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae,
20 Streptomycetaceae oder Nocardiaceae, Hefen wie Pichia, Saccharomyces oder Hansenula oder Pilze wie Beauveria oder Psilocybe besonders bevorzugt Bakterien der Gattungen Escherichia, Pseudomonas, Streptomyces, Nocardia, Burkholderia, Salmonella, Agrobacterium oder Rhodococcus verwendet. Ganz besonders bevorzugt
25 ist die Gattung und Art Escherichia coli. Weitere vorteilhafte Bakterien sind darüberhinaus in der Gruppe der α -Proteobakterien, β -Proteobakterien oder γ -Proteobakterien zu finden.

- Der Wirtsorganismus oder die Wirtsorganismen gemäß der Erfindung
30 enthalten dabei vorzugsweise mindestens eine der in dieser Erfindung beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte oder Vektoren, die für L-Pantolacton-Hydrolasen kodieren.

- 35 Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Organismen werden je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet. Mikroorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen
40 Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0°C und 100°C, bevorzugt zwischen 10°C bis 60°C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei kann der pH der Nährflüssigkeit auf einen festen
45 Wert gehalten werden, das heißt während der Anzucht reguliert werden oder nicht. Die Anzucht kann batch weise, semi batch weise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der

Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nach gefüttert werden. Gleiches gilt für Induktoren wie beispielsweise Isopropythiogalactosid, (IPTG), Lactose, Arabinose, Rhamnose und Antibiotika bzw. Temperatur-Shifts, die je nach
5 verwendetem Promotor die Expression des erfindungsgemäßen Gens anschalten. Das racemische Pantolacton kann direkt zur Anzucht gegeben werden oder vorteilhaft nach Anzucht. Die Enzyme können nach dem in den Beispielen beschriebenen Verfahren aus den Organismen isoliert werden oder als Rohextrakt für die Reaktion
10 verwendet werden.

Die Wirtsorganismen enthalten vorteilhaft 0,5 U/g BTM (= Bio-trockenmasse) L-Pantolacton-Hydrolaseaktivität, bevorzugt 4 U/g BTM, besonders bevorzugt 20 bis 150 U/g BTM, ganz besonders
15 bevorzugt 40 bis 600 U/g BTM.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorteilhaft bei einer Temperatur zwischen 0°C bis 95°C, bevorzugt zwischen 10°C bis 85°C, besonders bevorzugt zwischen 15°C bis 75°C durchgeführt.

20 Der pH-Wert im erfindungsgemäßen Verfahren wird vorteilhaft zwischen pH 4 und 12, bevorzugt zwischen pH 6 und 9, besonders bevorzugt zwischen pH 6 und 8, ganz besonders bevorzugt zwischen pH 6,5 und 7,5 gehalten.

25 Unter racemischen Pantolacton im erfindungsgemäßen Verfahren ist Pantolacton zu verstehen, das aus einem 50:50 Gemisch der beiden Enantiomere oder aus einem beliebigen anderen Gemisch mit einer Anreicherung eines der beiden Enantiomere im Gemisch besteht.

30 Unter enantiomerenreinen bzw. chiralen Pantolacton (D- oder L-Enantiomer) sind im erfindungsgemäßen Verfahren Enantiomere zu verstehen, die eine Enantiomerenanreicherung zeigen. Bevorzugt werden im Verfahren Enantiomerenreinheiten von mindestens 70 %ee,
35 bevorzugt von min. 80 %ee, besonders bevorzugt von min. 90 %ee, ganz besonders bevorzugt min. 98 %ee erreicht.

Für das erfindungsgemäße Verfahren können wachsende Zellen verwendet werden, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, Nuklein-
40 säurekonstrukte oder Vektoren enthalten. Auch ruhende oder aufgeschlossene Zellen können verwendet werden. Unter aufgeschlossenen Zellen sind beispielsweise Zellen zu verstehen, die über eine Behandlung mit beispielsweise Lösungsmitteln durchlässig gemacht worden sind, oder Zellen die über eine Enzymbehandlung, über eine
45 mechanische Behandlung (z.B. French Press oder Ultraschall) oder über eine sonstige Methode aufgebrochen wurden. Die so erhaltenen Rohextrakte sind für das erfindungsgemäße Verfahren vorteil-

haft geeignet. Auch gereinigte oder angereinigte Enzyme können für das Verfahren verwendet werden. Ebenfalls geeignet sind immobilisierte Mikroorganismen oder Enzyme, die vorteilhaft in der Reaktion Anwendung finden können.

- 5 Werden für das erfindungsgemäße Verfahren freie Organismen oder Enzyme verwendet, so werden diese vor der Extraktion zweckmäßigerweise abgetrennt beispielsweise über eine Filtration oder Zentrifugation. Dies ist bei Verwendung von immobilisierten
- 10 Organismen oder Enzymen vorteilhaft nicht notwendig, kann aber auch erfolgen.

- Das im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten D-Pantolacton läßt sich vorteilhaft aus der wäßrigen Reaktionslösung über
- 15 Extraktion oder Kristallisation oder vorteilhaft über Extraktion und Kristallisation gewinnen. Hierzu wird die wäßrige Reaktionslösung mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert. Die Extraktion kann zur Erhöhung der Ausbeute mehrfach wiederholt werden. Vorteilhaft wird die Lösung vor Extraktion auf ca. 0°C
- 20 bis 10°C gekühlt. Die wäßrige Lösung wird vor dem Herunterkühlen oder danach vorteilhaft auf ca. pH 6,0 bis pH 7,0 neutralisiert, um die freie Säure in das Salz zu überführen, so daß sie unter den Reaktionsbedingungen nicht extrahiert werden kann. Für die Neutralisation wird beispielsweise Bicarbonat oder eine andere
- 25 Base wie NaOH oder KOH genommen. Als organische Lösungsmittel können prinzipiell alle Lösungsmittel verwendet werden, die mit Wasser gegebenenfalls nach Zugabe von Salzen eine Phasengrenze zeigen und in die das Lacton aus der wäßrigen Phase übergehen kann. Vorteilhafte Lösungsmittel sind Lösungsmittel, die nur
- 30 wenig Wasser aufnehmen, so daß nur wenig Säure in das Lösungsmittel übergeht wie Toluol, Methylenchlorid, Butylacetat, Diisopropylether, Benzol, Methyltertiärbutylether, Methylisobutylketon, Diethylketon oder Essigester.
- 35 Nach Einengen der organischen Phase können die Produkte in der Regel in guten chemischen Reinheiten, das heißt größer 90 % chemische Reinheit, gewonnen werden. Nach Extraktion kann die organische Phase mit dem Produkt aber auch nur zum Teil eingengt werden und das Produkt auskristallisiert werden. Dazu wird die
- 40 Lösung vorteilhaft auf eine Temperatur von 0°C bis 10°C abgekühlt. Die Kristallisation kann auch direkt aus der organischen Lösung oder aus einer wäßrigen Lösung erfolgen. Das auskristallisierte Produkt kann nochmals im gleichen oder in einem anderen Lösungsmittel zur erneuten Kristallisation aufgenommen werden und noch-
- 45 mals kristallisiert werden. Durch die anschließende vorteilhafte mindestens einmalige Kristallisation kann die Enantiomerenreinheit des Produktes falls erforderlich weiter gesteigert werden.

Vorteilhaft kann jedoch das entstandene D-Pantolacton direkt als organische Lösung ohne Kristallisation verwendet werden.

Das in wäßriger Lösung verbliebene L-Enantiomer kann durch An-
5 säuren beispielsweise mit Schwefelsäure zum Lacton geschlossen werden und anschließend wie oben beschrieben extrahiert werden. Zur Lactonisierung wird die Lösung vorteilhaft erwärmt. Das gewonnene L-Lacton kann nach Abziehen des Lösungsmittels in der Schmelze mit katalytischen Mengen (ca. 1 bis 5 % Mol%) einer Base
10 wie NaOH, Na-Pantoat oder Na-Methylat racemisiert und rückgeführt werden. Durch die vorteilhafte Racemisierung und Rückführung des unerwünschten Enantiomers kann im erfindungsgemäßen Verfahren eine theoretische Ausbeute von 98 % erreicht werden.

15 Bei den genannten Aufarbeitungsarten läßt sich das Produkt des erfindungsgemäßen Verfahrens in Ausbeuten von 60 bis 100 %, bevorzugt von 80 bis 100 %, besonders bevorzugt von 90 bis 100 % bezogen auf das für die Reaktion eingesetzte racemische Panto-
lacton isolieren. Das isoliert Produkt zeichnet sich durch eine
20 hohe chemische Reinheit von > 90 %, bevorzugt > 95 % besonders bevorzugt von > 98 % aus. Weiterhin haben die Produkt eine hohe Enantiomerenreinheit, die vorteilhaft falls erforderlich durch die Kristallisation weiter gesteigert werden kann.

25 Das erfindungsgemäße Verfahren kann batchweise, semi-batchweise oder kontinuierlich betrieben werden.

Die so gewonnenen Produkte eignen sich als Ausgangsmaterial für die Synthese von Panthenol, Pantethin und deren Derivate. Diese
30 Stoffe und das erhaltene enantiomerenreine Pantolacton können in Kombination miteinander oder allein zur Herstellung von Pharmaka, Nahrungsmittel, Tierfutter oder Kosmetika verwendet werden.

Die nachstehenden Beispiele verdeutlichen die Erfindung.

35

Beispiele:

1. L-Pantolacton-Hydrolyse mit *Burkholderia caryophylli* Lu681

40 *Burkholderia caryophylli* Lu681 (oder andere der in Tabelle 1a, 1b angegebenen Stämme) wurden 1 bis 3 Tage in 25 ml Komplexmedium (z.B. HFP = 1 % Pepton, 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,3 % NaCl) angezogen, geerntet, in Puffer gewaschen und resuspendiert (5 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,0) und 3 h bei 30°C mit 50 mM
45 D,L-Pantolacton inkubiert. Nach Abtrennung der Zellen wurden die Konzentrationen an D,L-Pantolacton, D,L-, D-, und L-Pantoinsäure durch GC- bzw. HPLC-Analyse bestimmt (Tab. 1a). Alternativ wurde

die Umsetzung über Nacht unter Titration mit 4 M NaOH durchgeführt (4 ml Zellsuspension, 50 mM D,L-Pantolacton, 50 mM Tris/HCl pH 7,0 ad 20 ml dest. Aqua; Tab. 1b). Alle Stämme der Tabelle 1 hydrolysierten das racemische Pantolacton zu L-Pantoinsäure.

- 5 Der ee-Wert bei hohem Umsatz (>45 %) und damit die Enantio-selektivität E des Enzyms wurde nach Straathof und Jongejan, *Enzyme & Microbiol. Technology* 21: 559-571, 1997 bestimmt.

2. Verifizierung der hydrolytischen Aktivität

10

Burkholderia caryophylli Lu681 (oder andere Stämme aus Tab. 1) wurden 1 bis 3 Tage in 25 ml Komplexmedium (z.B. HFP = 1 % Pepton, 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,3 % NaCl) angezogen, geerntet, in Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen und resus-

- 15 pendiert (5 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,0) und 3 h bei 30°C mit 50 mM Ketopantolacton inkubiert. Nach Abtrennung der Zellen wurden die Konzentrationen an Ketopantolacton, Ketopantoinsäure, D,L-Pantolacton, D,L-, D-, und L-Pantoinsäure durch HPLC-Analyse bestimmt (Tab. 1a). Alle aufgeführten Stämme außer *Beauveria amorph*

- 20 *Lu7953* vermochten die aus Ketopantolacton durch spontane Hydrolyse entstehende Ketopantoinsäure zu Pantoinsäure zu reduzieren. Da bei allen Stämmen jedoch D- Pantoinsäure anstelle des unter Beispiel 1 beschriebenen L-Pantoinsäure gebildet wurde, kann die Umsetzung von Pantolacton zu L-Pantoinsäure nicht durch einen

- 25 Oxidations-Reduktionsprozeß (über Ketopantolacton und Ketopantoinsäure) entstehen. Es wurde auch im dialysierten Rohextrakt von *Lu681* oder *Lu5351* und bei Einsatz der gereinigten Enzyme aus *Lu681* und *Lu5351* keine Abhängigkeit der L-Pantolacton-Hydrolyse von Cofaktoren festgestellt. Die enzymatische Aktivität läßt

- 30 sich damit auf ein hydrolytisches Enzym zurückführen.

3. Herstellung von D-Pantolacton durch Hydrolyse mit verschiedenen Wildtypstämmen

- 35 a. *Burkholderia caryophylli* Lu681

Burkholderia caryophylli Lu681 wurde in 200 ml Komplexmedium (z.B. GYP = 1 % D-Glucose, 0,5 % Polypepton, 0,5 % Hefeextrakt) angezogen (OD600 = 6,7, BTM = 2,97 g/l), geerntet und gewaschen.

- 40 10 ml der 10fach konzentrierten Suspension wurden mit 50 mM D,L-Pantolacton in 50 mM Tris/HCl pH 7,0 (Ansatzvolumen 20 ml) bei 30°C unter Titration mit 4 M NaOH auf pH 7,0 inkubiert. Nach 3 h und 19,5 h wurden der Umsatz c und der ee-Wert durch HPLC-Analyse bestimmt (3 h: c = 45 %, ee = 95 %; 19,5 h: c = 59 %, ee = 89 %
- 45 bzgl. L-Pantoinsäure). Letzteres entspricht D-Pantolacton mit ee-Werten von 73 % bzw. 100 %.

b. *Agrobacterium radiobacter* Lu5351

Agrobacterium radiobacter Lu5351 wurde in 200 ml Komplexmedium (z.B. HFP = 1 % Pepton, 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,3 % NaCl) angezogen (OD600 = 11,5, BTM = 2,90 g/l), geerntet und gewaschen. 10 ml der 10fach konzentrierten Suspension wurden mit 50 mM D,L-Pantolacton in 50 mM Tris/HCl pH 7,0 (Ansatzvolumen 20 ml) bei 30°C unter Titration mit 4 M NaOH auf pH 7,0 inkubiert. Nach 3 h und 19,4 h wurden der Umsatz c und der ee-Wert durch HPLC-Analyse bestimmt (3 h: c = 20 %, ee = 93 %; 19,4 h: c = 53 %, ee = 94 % bzgl. L-Pantoinsäure). Letzteres entspricht D-Pantolacton mit ee-Werten von 21 % bzw. 100 %.

c. *Pseudomonas diminuta* Lu683

Pseudomonas diminuta Lu683 wurde in 200 ml Komplexmedium (z.B. GYP = 1 % D-Glucose, 0,5 % Polypepton, 0,5 % Hefeextrakt) angezogen (OD600 = 7,3, BTM = 3,78 g/l), geerntet und gewaschen. 10 ml der 10fach konzentrierten Suspension wurden mit 50 mM D,L-Pantolacton in 50 mM Tris/HCl pH 7,0 (Ansatzvolumen 20 ml) bei 30°C unter Titration mit 4 M NaOH auf pH 7,0 inkubiert. Nach 3 h und 19,3 h wurden der Umsatz c und der ee-Wert durch HPLC-Analyse bestimmt (3 h: c = 48 %, ee = 97 %; 19,4 h: c = 69 %, ee = 79 % bzgl. L-Pantoinsäure). Letzteres entspricht D-Pantolacton mit ee-Werten von 82 % bzw. 100 %.

d. *Apiotrichum humicola* Lu3215

Apiotrichum humicola Lu3215 wurde in 200 ml Komplexmedium (z.B. HFP = 1 % Pepton, 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,3 % NaCl) angezogen (OD600 = 18,5, BTM = 7,34 g/l), geerntet und gewaschen. 10 ml der 10fach konzentrierten Suspension wurden mit 50 mM D,L-Pantolacton in 50 mM Tris/HCl pH 7,0 (Ansatzvolumen 20 ml) bei 30°C unter Titration mit 4 M NaOH auf pH 7,0 inkubiert. Nach 3 h und 19,4 h wurden der Umsatz c und der ee-Wert durch HPLC-Analyse bestimmt (3 h: c = 55 %, ee = 79 % bzgl. L-Pantoinsäure). Letzteres entspricht D-Pantolacton mit ee-Werten von 84 %.

4. Isolierung der L-Pantolacton-Hydrolase aus *Burkholderia caryophylli* Lu681

Burkholderia caryophylli Lu681 wurde in 14 l Komplexmedium (HFP = 1 % Pepton, 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,3 % NaCl) bis OD600 = 10 (3 g/l BTM) angezogen, geerntet, aufgeschlossen und die L-Pantolacton-Hydrolase (ca. 200 U) aus dem Rohextrakt gereinigt. Dazu wurden die Zellen (1128 g Feuchtmasse) zunächst durch eine Behandlung mit einem Ultra-Turrax Stab im Puffer

- (1,8 l, 20 mM Tris/HCl, pH 7,4) resuspendiert. Endvolumen 3 l. Diese Lösung wurde dann auf einer Glasnutsche durch ein Bett Glaskugeln (0,1 bis 0,2 mm, 200 ml) von groben Partikeln befreit. Diese Zellsuspension (3,2 l) wurde 2 mal bei 1500 bar im
- 5 Z04 Microfluidizer homogenisiert. Das Gerät wurde mit 500 ml Puffer gespült. Die vereinigten Volumina (4 l) wurden einer ersten Fällung mit 200 ml einer 1M Manganchlorid-Lösung unterzogen (Endkonzentration 50 mM). Der pH wurde durch Zugabe von Natronlauge auf pH 7,0 gehalten. Der Niederschlag wurde 30 Minuten
- 10 bei 6000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand (3,1 l) wurde mit 200 ml einer 0,2 M EDTA-Lösung (pH 7,5) versetzt. Durch die Zugabe sank der pH auf 5,0 ab. Es bildete sich ein Niederschlag, der wiederum bei 6000 U/min (20 Minuten, Sorvall) abzentrifugiert wurde. Der Überstand (3,4 l) wurde auf pH 7,0 zurücktitriert.
- 15 Anschließend wurden 989 g Ammoniumsulfat (entsprechend einer 50%igen Sättigung) zugegeben und 10 Minuten gerührt. Die Trübung wurde 20 Minuten bei 6000 Upm abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand (3,7 l) wurde geteilt: 1,2 l wurden in einer Phenyl-
- 20 sepharose Chromatographie eingesetzt. Die Phenyl-Sepharose Säule (Pharmacia, Durchmesser 5 cm, Höhe 25 cm, Volumen 490 ml) wurde mit 1 l Puffer A (20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, 40 % Ammoniumsulfat) gewaschen und im Gradienten mit Puffer B (20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4)
- 25 eluiert. Bei einem Fluß von 10 ml/min wurden 100 % Puffer-B nach 120 Minuten erreicht und für 40 Minuten gehalten. Aktive Fraktionen wurden gesammelt und vereinigt (250 ml).
- Nach Verdünnung auf < 7 mS/cm wurden diese 3 l durch Chromato-
- 30 graphie an Q-Sepharose (Durchmesser 5 cm, Höhe 25 cm, 430 ml, Fast Flow, Pharmacia) gereinigt. Die Säule wurde mit 1 l Puffer (20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 gewaschen (10 ml/min). Der Gradient mit Puffer B (Puffer A mit 1 M NaCl) wurde linear auf 100 % B in 120 Minuten gebracht und für weitere 40 Minuten bei
- 35 linear 100 % gehalten. Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt und vereinigt (118 ml). Dieses Volumen wurde konzentriert (10 kD Omega-Membran) und gegen 5 l 10 mM Tris/HCl pH 7,0 dialysiert; Endvolumen 21 ml. 6 ml dieses Volumens wurden auf eine Waters Q HR8 aufgetragen. Die Säule wurde zuvor äquilibriert mit Puffer A
- 40 (20 mM Mes, pH 6,0) und dann entwickelt mit einem Gradienten (1 % pro Minute) nach Puffer B (wie Puffer A mit 0,5 M NaCl). Aktive Fraktionen wurden vereinigt (3,7 ml) und zwei mal gegen 2 l 10 mM Tris/HCl pH 7,0 dialysiert. Das Dialysat trübte sich ein und wurde daher abzentrifugiert (4 ml).

Dieses Material wurde dann durch Chromatographie an Mono P (Pharmacia, Durchmesser 0,5 cm, Volumen 5 ml) getrennt. Die Mono-P Fraktionen wurden in 0,2 ml Portionen durch eine Acetonfällung bei -20 Grad Celsius konzentriert.

5

- Die Pellets wurden dann in 0,005 ml SDS-Probenpuffer ohne DTT aufgenommen und auf ein SDS-Gel gegeben (Tris/Glycin Gel 12 %, Fa. Novex ca. 2,5 h 125 V, 50 mA, Laemmli, U.K., 1970, Nature, 227:680-685). Die L-Pantolacton-Hydrolase wurde nach der Trennung
- 10 durch eine Aktivitätsfärbung identifiziert und ausgeschnitten. Hierzu wurde das Gel kurz in TBS-Puffer (= 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,4) geschwenkt und dann mit 50 ml TBS + 50 ml α -Naphthylacetat-Lösung (Sigma N-8505, 0,4 g/l in 10 % Aceton) 10 min. vorinkubiert. Anschließend wurden 50 ml Fast Red TR-
- 15 Lösung (Sigma F-8764, 1 g/l) zugegeben und das Gel weiter bei RT (= ca. 23°C) geschwenkt. Die L-Pantolacton-Hydrolase war als rotbraun gefärbte Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 36 kDa zu erkennen. Das Protein in den ausgeschnittenen Gelstücken wurde durch Trypsin verdaut und die Peptide sequenziert.
- 20 Das Restgel wurde mit Coomassie Blau angefärbt. Es wurden zwei Peptidsequenzen (SEQ ID NO: 3 und 4) erhalten.

5. Isolierung der L-Pantolacton-Hydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* Lu5351

25

- Agrobacterium radiobacter* Lu5351 wurde in 14 l Komplexmedium (z.B. HFP = 1 % Pepton, 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,3 % NaCl) bis OD600 = 10 (3 g/l BTM) angezogen, geerntet, aufgeschlossen und die L-Pantolacton-Hydrolase (ca. 60 U) aus dem
- 30 Rohextrakt gereinigt (Tab. 2). Dazu wurden die Zellen (400 g Feuchtmasse) von *Agrobacterium radiobacter* (Lu 5351) zunächst durch eine Behandlung mit einem Ultra-Turrax Stab im Puffer (1,8 l, 20 mM Tris/HCl, pH 7,4) resuspendiert (Endvolumen 2,2 l). Diese Lösung wurde dann auf einer Glasnutsche durch ein Bett
- 35 Glaskugeln (0,1 bis 0,2 mm, 200 ml) von groben Partikeln befreit. Diese Zellsuspension wurde 2 mal bei 1500 bar im 204 Microfluidizer homogenisiert. Das Gerät wurde mit 500 ml Puffer gespült. Die vereinigten Volumina (2,7 l) wurden einer ersten Fällung mit 135 ml einer 1 M Manganchlorid-Lösung unterzogen
- 40 (Endkonzentration 50 mM). Der pH wurde durch Zugabe von Natronlauge auf pH 7,0 gehalten und der Niederschlag 30 min bei 6000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand (2,6 l) wurde mit 575 ml einer 0,2 M EDTA-Lösung versetzt und der pH erneut kontrolliert. Zu diesen 3,15 l wurden 711 g Ammoniumsulfat
- 45 (entsprechend einer 40%igen Sättigung) gegeben und 10 Minuten gerührt. Die Trübung wurde 30 min bei 6000 Upm abzentrifugiert.

Der erhaltene Überstand (3,3 l) wurde in einer Phenylsepharose Chromatographie eingesetzt.

Die Phenyl-Sepharose Säule (Pharmacia, Durchmesser 5 cm, Höhe
5 25 cm, Volumen 490 ml) wurde mit 1 l Puffer A (20 mM Natrium-
phosphatpuffer, pH 7,4, 40 % Ammoniumsulfat) gewaschen und im
Gradienten mit Puffer B (20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4)
eluiert. Bei einem Fluß von 10 ml/min wurden 100 % B nach 120 min
erreicht und für 40 min gehalten. Aktive Fraktionen wurden ge-
10 sammelt und vereinigt (350 ml, 20,9 mS).

Nach Verdünnung auf 7 mS/cm (3,1 l Endvolumen) wurde eine
Chromatographie an Q-Sepharose (Durchmesser 5 cm, Höhe 25 cm,
430 ml, Fast Flow, Pharmacia) durchgeführt. Die Säule wurde
15 mit 1 l Puffer A (20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 gewaschen
(10 ml/min). Der Gradient mit Puffer B (Puffer A mit 1 M NaCl)
wurde auf 100 % B in 120 Minuten gebracht und für weitere
40 Minuten bei 100 % gehalten. Die aktiven Fraktionen wurden
gesammelt und vereinigt (134 ml). Dieses Volumen wurde konzen-
20 triert (10 kD Omega-Membran) und gegen 3 l 10 mM Tris/HCl pH 7,0
dialysiert (Endvolumen 19 ml). 6 ml dieses Volumens wurden auf
eine Waters Q HR8 aufgetragen. Die Säule wurde zuvor äquili-
briert mit Puffer A (20 mM Mes, pH 6,0) und entwickelt mit einem
Gradienten (1 % pro Minute) nach Puffer B (wie Puffer A mit 0,5 M
25 NaCl). Aktive Fraktionen wurden vereinigt (12,5 ml) und gegen 5 l
10 mM Natriumacetatpuffer pH 5,0 dialysiert. Das Dialysat trübte
sich ein und wurde daher abzentrifugiert.

Der Überstand wurde dann durch Chromatographie an Mono P (Pharma-
30 cia, Durchmesser 0,5 cm, Volumen 5 ml) getrennt.

Die Mono-P Fraktionen wurden in 0,2 ml Portionen durch eine
Acetonfällung bei -20 Grad Celsius konzentriert. Die Pellets
wurden dann in 0,005 ml SDS-Probenpuffer ohne DTT aufgenommen und
35 auf ein SDS-Gel gegeben. Die L-Pantolacton-Hydrolase wurde nach
der Trennung durch eine Aktivitätsfärbung identifiziert (siehe
Beispiel 4) und ausgeschnitten. Sie war als rot-braun gefärbte
Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 36 kDa zu er-
kennen. Das Protein in den ausgeschnittenen Gelstücken wurde
40 durch Trypsin verdaut und die Peptide wurden sequenziert. Das
Restgel wurde mit Coomassie Blau angefärbt. Es wurden zwei
Peptidsequenzen (SEQ ID NO: 5 und 6) erhalten. Die Sequenzierung
von SEQ ID NO: 5 ergab eine Unklarheit bei der ersten Aminosäure
der Sequenz. Das in Position 1 wiedergegebene Tyrosin kann auch
45 ein Leucin sein die Sequenz war hier nicht eindeutig.

6. Substratspezifität der gereinigten L-Pantolacton-Hydrolasen aus Lu681 und Lu5351

0,1 U/ml einer Phenylsepharose-Wertpeakfraktion der angereinigten
5 Enzyme aus Lu681 oder Lu5351 wurden in 150 mM Pipes pH 6,8 mit verschiedenen Estern und Lactonen inkubiert. Nach 0, 1 und 20 h wurden Proben gezogen, die Reaktion durch Zentrifugation durch eine 10 kDa-Filtermembran gestoppt und die Konzentration des Substrates sowie der korrespondierenden Säure durch HPLC-Analyse
10 bestimmt. Die Aktivität ist in den Tabellen 3a und 3b im Vergleich zur Aktivität mit L-Pantolacton angegeben.

Für das Lipasesubstrat 1,2-O-Dilauryl-rac-glycero-3-glutar-säure-resorufinester wurde für das Lu681-Enzym ein optischer
15 Test in der Mikrotiterplatte durchgeführt (Boehringer Mannheim, modifiziert). 60 bis 482 U/l Enzym wurden in 45 mM KH_2PO_4 pH 6,8 mit 0,18 g/l Resorufinester (2 g/l in Dioxan + 2 % SDS + 10 % H_2O) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion E wurde nach 2 min und 82 min bei 572 nm gemessen. Tab. 3c zeigt die Extinktions-
20 differenz und die daraus berechnete Lipase-Aktivität, die ca. 0,05 % von der L-Pantolacton-Hydrolase-Aktivität beträgt.

7. Inhibition und Aktivierung der gereinigten L-Pantolacton-Hydrolasen aus Lu681 und Lu5351

25

0,1 U/ml einer Phenylsepharose-Wertpeakfraktion der angereinigten Proteine aus Lu681 oder Lu5351 wurden 5 min mit verschiedenen Effektorsubstanzen in 150 mM Pipes (pH 7.0) vorinkubiert. Der Assay wurde durch Zugabe von 150 mM L-Pantolacton gestartet (1 h
30 30°C) und durch Zentrifugation durch eine 10 kDa-Filtermembran gestoppt. Anschließend wurden die Konzentrationen an D,L-, D-, und L-Pantoinsäure durch HPLC-Analyse bestimmt. Die Tabellen 4a und 4b zeigen die Aktivität im Vergleich zur Probe ohne Zusatz einer Effektorsubstanz. Insgesamt sind die gereinigten Enzyme
35 aus Lu681 und Lu5351 unempfindlich (> 85 % Restaktivität) gegen chelatisierende Substanzen, SH-Reagenzien, Protease-Inhibitoren, Detergenzien (Ausnahme: Lu5351 mit 74 %-Restaktivität in 1 % SDS) und verschiedene Kationen.

40 Eine signifikante Aktivierung (+ 20 %) ist allenfalls mit HgCl_2 festzustellen (133 / 170 %). Desweiteren wurde für die rekombinante 681-Lactonase (E. coli-Zellen, s. Bsp. 8ff.) eine kompetitive Hemmung durch D-Pantolacton nachgewiesen.

45

8. Genbank+Screening: Klonierung der L-Pantolacton-Hydrolase aus *Burkholderia caryophylli* Lu681

Genomische DNA aus *Burkholderia caryophylli* Lu681 wurde isoliert (Qiagen, Hilden), mit EcoRI verdaut und in mit EcoRI geschnittenen und dephosphorylierten pBluescriptKS+-Vektor ligiert (Maniatis, T., Molecular Cloning: A laboratory manual, 1989). Das Ligationsgemisch wurde gemäß Instruktion der Fa. Stratagene (La Jolla, Calif.) in *E. coli* XL1Blue transformiert. Die Transformanten wurden auf LB-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml), IPTG (= Isopropyl-β-thiogalactosid, 0,2 mM) und X-Gal (80 mg/l) ausplattiert und über Nacht bei 30 oder 37°C inkubiert. Die weißen Kolonien wurden gepickt auf LB-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml), IPTG (0,2 mM) und X-Gal (80 mg/l) und wiederum über Nacht inkubiert. Anschließend wurde durch Filterabklatsch mit sterilen Nitrocellulosefiltern eine Kopie dieser Masterplatte auf LB-Ampicillin- (100 mg/ml) IPTG-Platten angelegt. Der Filter wurde nach Inkubation über Nacht auf dieser Platte (s.o.) einem Aktivitätstest mit 150 mM L-Pantolacton, 0,1 % Nitrazingelb und 10 mM Tris/HCL pH 7,0 unterzogen (3 h-ÜN 30°C). Ein Klon mit Gelbfärbung (XL1Blue pKS+681) wurde isoliert.

9. Restriktionskartierung und Sequenzierung des EcoRI-Inserts aus *E. coli* XL1Blue pKS+681

25

Aus *E. coli* XL1Blue pKS+681 wurde die Plasmid-DNA gemäß Instruktion der Fa. Qiagen (Hilden) isoliert und mit den Restriktionsenzymen EcoRI, BamHI, PstI und HindIII einzeln bzw. im Doppelverdau geschnitten. Die fragmentierte DNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese im 0,8%igen Agarosegel analysiert. Aus den erhaltenen Fragmentgrößen resultiert die in Fig. 3 abgebildete Restriktionskarte des 7,5 kB-Insert. Es wurde vollständig sequenziert (Sanger et al. 1977) und enthält u.a. die Nukleotidsequenz ID NO: 1. Die abgeleitete Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 2) wiederum enthält die Peptide YGIEGLNNLEAL und AKEDANSTIEAED (SEQ ID NO: 3 und 4), die nach tryptischem Verdau der gereinigten und geblotteten L-Pantolacton-Hydrolase aus *Burkholderia caryophylli* Lu681 und *Agrobacterium radiobacter* Lu5351 gefunden wurden (siehe Beispiel 4 und 5).

40

Datenbankabgleiche (Genbank, EMBL, SwissProt Stand 7.5.99, [Sptrembel] bzw. 5.1.99 [PIR]) der Nukleotid- und der abgeleiteten Aminosäuresequenz ergaben lediglich eine geringe Homologie zu einer Gruppe hypothetischer Proteine und zu bestimmten Tetracyclin-Cyclasen aus Streptomyceten (Tab. 5). Insbesondere das Motiv mit der Consensus-Sequenz HTGTHVDAP ist in allen Proteinen hochkonserviert. Außerdem wurde eine Homologie von 48 %

(38% identische Aminosäuren) zur Isatin-Hydrolase aus *Pseudomonas putida* WW2 gefunden (WO 94/09175), die ebenfalls das genannte Sequenzmotiv enthält. Da keine Homologie zu anderen Lactonasen, Esterasen oder Lipasen gefunden wurde, handelt es sich bei den
5 gefundenen L-Pantolacton-Hydrolasen um eine neue Klasse von Enzymen. Die Sequenzvergleiche lassen eine entfernt verwandte phylogenetische Familie vermuten, zu der auch die benannten hypothetischen Proteine und Tetracyclin-Cyclasen sowie die Isatin-Hydrolase gehören.

10

10. L-Pantolacton-Hydrolyse durch *E. coli* XL1Blue pKS+681

Eine volle Impföse *E. coli* XL1Blue pKS+681 wurde nach Wachstum (ÜN = über Nacht, 37°C) auf einer LB-Platte mit Ampicillin
15 (100 µg/ml), IPTG (0,2 mM) und X-Gal (80 mg/l) in 0,5 ml Tris-HCl pH 7,0 und 50 mM D,L-Pantolacton resuspendiert (OD600 = 2,5). Als Vergleich diente eine entsprechende *E. coli* XL1Blue pBlue-scriptKS+-Probe (OD600 = 2,5). Nach 1 h wurden die Zellen abzentrifugiert und D,L-Pantolacton, D,L-, D-, und L-Pantoinsäure
20 durch HPLC-Analyse bestimmt. Tab. 6a zeigt Aktivitäten und ee-Werte der verschiedenen Proben. Die Suspension besaß eine Aktivität von ≥90 U/L. In Flüssigkultur-Ansätzen (vgl. Beispiel 12) war jedoch keine signifikante Aktivität zu erkennen.

25 11. Expressionsklonierung der L-Pantolacton-Hydrolase in *E. coli* XL1Blue pKK223-3

Anhand der Nukleotidsequenz SEQ ID NO: 1 wurden die Oligonukleotide 5'- CCGGAATTCATGTGCAACAACTGC (P1) und 5'- CCCAAGCTTCA-
30 GACCAGGGCCAGAA (P2) abgeleitet als Primer für eine PCR-Amplifikation des L-Pantolacton-Hydrolase-Gens unter den folgenden Bedingungen: 20 mM Tris/HCl pH 8,8, 2 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA, 25 mM je dNTP, 0,96 µg/ml pKS+681, je 2,2 µg/ml P1 und P2, 25U/ml Pfu-Polymerase
35 (Stratagene, LaJolla, Calif.); die PCR-Parameter waren wie folgt: 1 min 95°C, 1 min 55°C, 2,5 min 72°C, 30 Cyclen. Das erhaltene PCR-Produkt (0,8 kB) wurde mit EcoRI und HindIII geschnitten und in mit EcoRI und HindIII geschnittenen und dephosphorylierten pKK223-3 (Pharmacia, Freiburg) ligiert. Das Ligationsgemisch
40 wurde in *E. coli* XL1 Blue bzw. TG1 transformiert (Stratagene, LaJolla, Calif.; DSMZ, Braunschweig, DSMZ-Nr. 6056, Inoue et al, 1990, Gene 96:23-28). Die Transformanten wurden auf LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Von dieser Transformationsplatte wurden analog zu Beispiel 8 ein Filterabklatsch und ein
45 anschließender Aktivitätstest durchgeführt, bei welchem ca. 100 intensiv gelbe Klone identifiziert wurden. Zehn wurden durch Minipräparation und Restriktionsverdau (EcoRI-HindIII, EcoRI-

HindIII-BamHI) der Plasmid-DNA analysiert (Maniatis, T., Molecular Cloning: A laboratory manual, 1989). Sie enthielten das in Fig. 4 abgebildete Plasmid pKK681.

5 12. L-Pantolacton-Hydrolyse durch E. coli XL1Blue pKK681

- E. coli XL1Blue pKK681 wurde in 30 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und IPTG (0,5 mM) über Nacht bei 37°C angezogen, geerntet und in Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen
- 10 und resuspendiert (3 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,0). 0,25 ml der Suspension wurden mit 150 mM L-Pantolacton, 150 mM Pipes pH 7,0 ad 0,5 ml A. dest. versetzt und 3 h bei 30°C inkubiert. Daneben wurden 0,25 ml der Suspension mit 50 mM D,L-Pantolacton, 50 mM Tris pH 7,0 ad 0,5 ml A. dest. versetzt und 3 h inkubiert.
- 15 Weiterhin wurden 2 ml der Suspension mit 300 mM D,L-Pantolacton, 50 mM Tris pH 6,8 ad 20 ml Aqua dest. versetzt und unter Titration mit 4 M NaOH auf pH 6,8 3 h inkubiert. Nach 1 h und nach 3 h wurden Proben entnommen, die Zellen abgetrennt und der Überstand auf D,L-Pantolacton, D,L-, D-, und L-Pantoinsäure
- 20 untersucht. Tab. 6b zeigt Aktivitäten und ee-Werte der verschiedenen Proben. Die Über-Nacht-Kultur (1x konzentriert) besitzt somit eine Aktivität von 90 bis 150 U/l.

- Bei Induktion von E. coli XL1Blue pKK681 in der früh-
- 25 exponentiellen Wachstumsphase (OD600 = 0,6, + 0,5 mM IPTG) besitzen die entsprechenden Zellen nach 5 h Inkubation bei 37°C in der spätexponentiellen Phase (OD600 = 4,1) eine Aktivität von ca. 480 U/l.

30 13. Expressionsklonierung der L-Pantolacton-Hydrolase in E. coli TG1 pDHE19

- Anhand der Nukleotidsequenz SEQ ID Nr.1 wurden die Oligonukleotide 5'-CAGGATGCCATATGTGCAACAAGTGC (P1) und 5'-CCCAAGCTTCA-
- 35 GACCAGGGCCAGAA (P2) abgeleitet als Primer für eine PCR-Amplifikation des L-Pantolacton-Hydrolase-Gens unter den folgenden Bedingungen: 20 mM Tris-HCl pH 8,8, 2 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA, 25 mM je dNTP, 0,96 µg/ml pKS+681, je 2,2 µg/ml P1 und P2, 25U/ml Pfu-Polymerase
- 40 (Stratagene, LaJolla, Calif.); die PCR-Parameter waren wie folgt: 1 min 95°C, 1 min 55°C, 2,5 min 72°C, 30 Cyclen. Das erhaltene PCR-Produkt (0,8 kB) wurde mit NdeI und HindIII geschnitten und in mit NdeI und HindIII geschnittenen und dephosphorylierten pDHE19 (Prof. Mattes, Stuttgart) ligiert. Das Ligationsgemisch
- 45 wurde in E. coli XL1 Blue bzw. TG1 transformiert (Stratagene, LaJolla, Calif.; DSMZ, Braunschweig, DSMZ-Nr. 6056, Inoue et al, 1990, Gene 96:23-28). Die Transformanten wurden auf LB-Ampi-

cillin-Platten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Von dieser Transformationsplatte wurden analog zu Beispiel 8 ein Filterabkutsch auf LB-Ampicillin-(100 µg/ml) Rhamnose-(2 g/l) Platten (LB = Luria Broth) und ein anschließender Aktivitätstest durchgeführt, bei welchem ca. 100 intensiv gelbe Klone identifiziert wurden. Zehn wurden durch Minipräparation und Restriktionsverdau (NdeI-HindIII, NdeI-HindIII-BamHI) sowie Sequenzanalyse der Plasmid-DNA analysiert (Maniatis, T., Molecular Cloning: A laboratory manual, 1989). Sie enthielten das in Fig. 5
10 abgebildete Plasmid pDHE681.

14. L-Pantolacton-Hydrolyse durch E. coli TG1 pDHE681

E. coli TG1 pDHE681 wurde in 14 l Minimalmedium mit 40 g/l
15 Glycerin und 2,5 g/l Rhamnose 6 bis 7 h bei 37°C angezogen, geerntet und in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen und ad 1,4 l Puffer resuspendiert. Die Aktivität der einfach konzentrierten Zellsuspension betrug im Standardassay (150 mM Pipes pH 7,0, 150 mM L-Pantolacton, 1 h 30°C) 680 bis 2700 U/l
20 bzw. 60 bis 160 g/BTM.

10 ml der 10fach konzentrierten Suspension wurden mit 50 mM D,L-Pantolacton in 50 mM Tris/HCl pH 7,0 (Ansatzvolumen 20 ml) bei 30°C unter Titration mit 4 M NaOH auf pH 7,0 inkubiert. Nach 0,4 h und 3 h wurden der Umsatz und der ee-Wert durch HPLC-
25 Analyse bestimmt (0,4 h: c = 48 %, ee = 92 %; 3 h: c = 58 %, ee = 72 % bzgl. L-Pantoinsäure). Dies entspricht D-Pantolacton mit ee-Werten von 84 % bzw. 100 %.

15. Herstellung von D-Pantolacton durch Hydrolyse mit E. coli
30 TG1 pDHE681

3 g D,L-Pantolacton wurden in 10 ml H₂O gelöst und mit 4 M NaOH auf pH 6,5 titriert. Nach Zugabe von 5 bis 10 ml Zellsuspension E. coli TG1 pDHE681 (Beispiel 14) und Auffüllen ad 20 ml mit H₂O
35 wurde die Reaktion bei 30°C unter Titration auf pH 6,8 15 bis 22 h inkubiert. Wahlweise wurden nochmals 0 bis 2 ml Zellsuspension zugesetzt und weitere 3 h inkubiert bzw. 3 x 5 ml Zellsuspension zugesetzt und weitere 90 h inkubiert. Figur 6 zeigt den Verlauf anhand des NaOH-Verbrauches. Je nach Umsatz und
40 Inkubationszeit wurden ee-Werte für D-Pantolacton von 71 bis 97 % erzielt. Anschließend wurden die Zellen aus den 22 ml-Ansätzen abzentrifugiert und mit 5 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,0 gewaschen und die Überstände vereinigt (20 bis 25 ml) und 3x mit einem Volumen Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde nach Zugabe
45 von 10 g Na₂SO₄ (wasserfrei) 1 h bei Raumtemperatur getrocknet. Der Niederschlag wurde abfiltriert, 1x mit Ethylacetat gewaschen und das Filtrat 3 h bei 40°C einrotiert. Der viskose Rückstand

wurde ausgewogen und durch HPLC, GC, GC-MS sowie H-NMR analysiert (Tab. 7). Er enthielt reines D-Pantolacton (ee 71 bis 87 % nach 50 bis 52 % Umsatz).

- 5 Die wäßrige Phase (21 ml; Na-L-Pantoat) wurde mit ca. 5 ml 3 M H_2SO_4 auf pH 1 gestellt, 15 min bei 80°C erhitzt und mit 8 g wasserfreiem Na_2SO_4 versetzt. Das erhaltene L-Pantolacton wurde analog 3x mit einem Volumen Ethylacetat extrahiert, mit Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Zur Rückführung in die Hydrolyse kann
10 die L-Pantolacton-Schmelze durch Erhitzen nach NaOH-Zugabe in Gegenwart von geringen Mengen Na-L-Pantoat racemisiert werden (3 h 180°C).

16. Herstellung von D-Pantolacton durch Hydrolyse mit L-Panto-
15 lacton-Hydrolase aus E. coli-Stämmen

L-Pantolacton-Hydrolase wurde direkt aus Fermenterbrühe von E. coli (TG1 pDHE681 bzw. bevorzugt Stämme, die Chaperone wie z.B. GroEL co-exprimieren) durch Zellaufschluß (2 x 1000 bar im
20 Microfluidizer), Zelltrümmerabtrennung (20 min 9000 g bei 10°C), 10-fache Konzentration über eine Cross-Flow-Filtration (HämoFlow F60, Fresenius, Membran mit Ausschluß von ca. 10 kDa) und Hitze-fällung (20 min 60°C, 20 min RT-10°C, Zentrifugation) gewonnen und auf eine spezifische Aktivität von ca. 3000 U/g Protein
25 angereichert. Dieses 10 x Homogenat besaß eine Aktivität von 63-100000 U/l und eine Proteinkonzentration von 20-30 g/l.

- Die Racematspaltungen von 2,3 M D,L-Pantolacton (30 %w/v) mit hitzegefälltem Homogenat (16000 U/l, 6 g/l Protein) wurden bei
30 30°C unter Titration mit 4 bis 10 M NaOH (pH 7,5) mit leichter Pufferung (6 bis 20 mM $NaHCO_3$) im 0,75 bis 1,0 l batch-Ansatz durchgeführt. Nach Inkubation über Nacht wurde das Enzym durch Cross-Flow-Filtration (HämoFlow F40, Fresenius, Membran mit Ausschluß von ca. 10 kDa) des Ansatzes von der Produkt-haltigen
35 Lösung getrennt, 1 bis 2 x mit VE-Wasser gewaschen und konzentriert. Anschließend wurde das Enzym erneut unter den obigen Bedingungen eingesetzt. Der Standzeitversuch zeigte eine Verdopplung der für einen ee-Wert von >90 % (D-PL) notwendigen Verweilzeit von 12 auf 24 h nach 6 d (Figur 7). Die Aktivitäts-
40 verluste sollten sich durch Verwendung größerer Volumina (z.B. 10-l-Ansatz für die F40-Kartusche) reduzieren lassen.

- Die Aufarbeitung von Racematspaltungsansätzen mit Homogenat (50,8 % Umsatz, 92,5% ee) erfolgte durch Extraktion mit 5 x 1
45 Vol. MTBE. Es wurden 43 % D-Pantolacton mit 91,4 % ee und 98,2 % Reinheit (GC_{int.st.}; bezogen auf 100 % Racemat). Nach Erhitzen (65°C/15 min) mit Schwefelsäure (konz., 25 ml) und abermaliger

Extraktion mit MTBE (5 x 1 Vol) wurden 53 % L-Pantolacton mit 62,3 % ee und 98,2 % Reinheit (GC_{int.st.}) erhalten. Verunreinigungen durch Protein oder DNA waren mit Standardverfahren nicht erkennbar.

5

* NaOH-Daten vom 6. Tag nicht verfügbar. 50,4 % Umsatz, 89,8 % ee bei 1390 min (23,17 h).

Proben vom 7. Tag nicht verfügbar, daher keine analytischen Daten

10

17. Herstellung von D-Pantolacton durch Hydrolyse mit immobilisierter L-Pantolacton-Hydrolase

L-Pantolacton-Hydrolase wurde wie in Beispiel 16 isoliert und an verschiedene Trägermaterialien wie das kommerziell erhältliche EupergitC (Röhm GmbH, Darmstadt) oder Deloxan DAPIII (Degussa, Frankfurt) gebunden.

EupergitC

20

Eupergit ist ein durch Epoxidgruppen aktiviertes Trägermaterial. Das Protein wird dadurch hauptsächlich an Aminogruppen kovalent fixiert.

- 25 Homogenat wurde zunächst durch Hitzebehandlung einer Fällung unterzogen. 1,1 l Homogenat wurden zu Mengen von je 550 ml für 30 Minuten bei 60°C inkubiert und dann für 20 Minuten auf Eis zur Abkühlung gestellt. Diese Lösung wurde zentrifugiert (1 Stunde 8000 U/min GS3 Rotor), um denaturiertes Protein abzutrennen. Der
- 30 Überstand wurde dann auf einer Hämoflow F40 Kartusche konzentriert und in einen 20 mM HEPES-Puffer, pH 7,5, umgepuffert. Die Menge Protein pro g Eupergit kann frei gewählt werden. In dem folgenden Beispiel wurden 7,2 g Protein in 270 ml Puffer mit 30 ml 1M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 verdünnt und mit 17,5 g
- 35 festem NaCl eingesalzt. Die hohe Salzmenge fördert die Bindung des Proteins an den Träger. Der pH wurde auf genau pH 6,8 eingestellt und zu dieser Lösung wurden dann 15 g trockenes Eupergit gegeben. Die Lösung wurde für 17 Stunden bei Raumtemperatur bewegt. Das Reaktionsgemisch wurde dann auf einer Glasnutsche
- 40 abgesaugt und der Träger mit Wasser gewaschen. Das feuchte Material wog ca. 60 g. Die Aufbewahrung erfolgte in einem 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,5.

Deloxan DAPIII, mit und ohne Reduktion

Deloxan ist ein mit Aminogruppen modifiziertes Silikat. Diese Aminogruppen können mit Glutardialdehyd unter Bildung einer Schiff'schen Base aktiviert werden. Der überschüssige Aldehyd wird dann gewaschen und das Protein zum aktivierten Träger hinzugegeben. Die freien Aminogruppen des Proteins reagieren unter Bildung einer zweiten Schiff'schen Base mit dem noch freien Aldehyd des gebundenen Glutardialdehyds. Dieses so immobilisierte Protein ist bereits einsetzbar. Die Schiff'sche Base neigt jedoch zur Hydrolyse, so daß das Protein langsam vom Träger in wäßriger Lösung abblutet. Dies kann durch Reduktion mit Natriumborhydrid vermieden werden. Dabei wird die Schiff'sche Base in ein sekundäres Amin umgewandelt. Voraussetzung dafür ist die Stabilität des Enzyms gegen eine Reduktion mit Natriumborhydrid.

Hitzegefällung des Homogenats wie bei der Immobilisierung auf EupergitC.

20 Aktivierung:

140 g Deloxan DAPIII wurde mit Wasser, dann mit 1,5 l 0,1M Natriumphosphatpuffer, pH 6, und 1,5 l 0,1M Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, gewaschen und resuspendiert. Dazu wurden 560 ml einer 2,5%igen Glutardialdehydlösung (pH 7,5 korrigiert im gleichen Puffer) gegeben und für 3 bis 4 Stunden reagiert. Der Träger wurde orangerot. Danach wurde der aktivierte Träger mit 6 l Wasser gewaschen und in 1 l Natriumphosphatpuffer (pH 7,5) resuspendiert.

30

Zu 40 g aktiviertem Deloxan wurden z.B. 10000 U (ca. 2,7 g Protein) L-Pantolacton-Hydrolase gegeben. Das Protein wurde mit dem aktivierten Träger für 18 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde über eine Glasnutsche vom Träger getrennt. Der Träger wurde mehrfach mit Wasser und dann mit 1 l 0,1M Phosphatpuffer, pH 7,2 und 1 M NaCl gewaschen. Die Hälfte des Trägers wurde entnommen (ohne Reduktion). Die andere Hälfte wurde wieder mit Wasser gewaschen und dann in 0,1 M Natriumboratlupuffer, pH 7,2, gegeben.

40 Reduktion durch Natriumborhydrid:

Zu dem in 80 ml Boratlupuffer resuspendierten Träger wurden 0,4 g Natriumborhydrid gegeben (0,5 %) und 3 Stunden bei Raumtemperatur bewegt. Dabei wurde das Trägermaterial wieder hellgelb. Der Träger wurde über eine Glasnutsche abgesaugt und mit 400 ml Boratlupuffer gewaschen. Danach wurde der Träger mit 1 l Wasser gewaschen und dann in 20 mM Phosphatlupuffer aufgenommen.

Racematspaltung

Zur Racematspaltung von 2,3 M D,L-Pantolacton (30 % w/v) mit Immobilisaten wurden diese unter Titration mit 10 M NaOH (pH 7,5) 5 in 10 mM NaHCO₃ in 40-ml-Ansätzen bei 30°C gerührt, bis der ee-Wert für D-Pantolacton bei ca. 90 % lag (25 bis 60 h). Der Biokatalysator wurde nach jedem Batch durch Filtration (Absaugen des Reaktionsansatzes durch einen HPLC-Laufmittel-Filter) vom Produkt getrennt und ggf. 3 x Waschen (VE-Wasser) zurückgewonnen. 10 Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die NaOH-Kurven der Standzeit-Versuche im gerührten Ansatz.

15

20

25

30

35

40

45

Tabelle 1a

LU Nr.	Gattung	Art	Pantoinsäure-Bildung (3 h)					direkte Hydrolyse (+) oder auch Oxid.-Red (-)
			PS [mM]	PS [g/l]	Aspez [U/g]	ee [%] unkorr.	ee [%] korr.	
22	Agrobacterium	tumefaciens	5,6	0,8	1,5	94,6	97,0	+
5351	Agrobacterium	radiobacter	4,8	0,7	1,6	97,3	100,0	+
3215	Apiotrichum	humicola	7,9	1,2	1,5	82,0	77,8	+
7953	Beauveria	amorpha	5,9	0,9	1,0	68,5	72,1	+
680	Burkholderia	solanacearum	2,1	0,3	0,5	70,3	80,9	+
681	Burkholderia	caryophylli	6,7	1,0	2,0	96,0	98,7	+
683	Pseudomonas	diminuta	6,0	0,9	1,1	98,0	100,0	+
863	Pseudomonas	sp.	7,3	1,1	1,9	92,0	94,0	+
4314	Psilocybe	coprophila	2,4	0,4	0,5	65,3	74,3	+

PS, Pantoinsäure
 ee-Werte beziehen sich auf die Bildung von (L)-Pantoinsäure
 ee, enantiomerer Überschuß, korr., korrigierter ee bei Abzug der durch chemische Hydrolyse gebildeten
 Pantoinsäure (Blank)

Tabelle 1b

LU Nr	Gattung	Art	Pantoinsäure-Bildung				
			ee [%]	ee [%] korr.	t [min]	Umsatz [%]	E (korr.)
22	Agrobacterium	tumefaciens	90,2	94,5	1352	6,8	38
5351	Agrobacterium	radiobacter	93,8	96,5	1161	52,5	>229
3215	Apiotrichum	humicola	79,4	79,1	91	54,0	29
7953	Beauveria	amorpha	31,3	33,8	288	20,6	3
680	Burkholderia	solanacearum	78,1	81,3	1318	54,1	37
681	Burkholderia	caryophylli	94,7	97,6	187	44,6	198
683	Pseudomonas	diminuta	96,3	98,7	185	48,5	524
863	Pseudomonas	sp.	89,5	91,9	1256	47,9	64
4314	Psilocybe	coprophila	42,6	49,7	1063	15,6	3

ee-Werte beziehen sich auf die Bildung von (L)-Pantoinsäure

ee, enantiomerer Überschuss; E, Enantioselektivität; korr., korrigierter ee oder E bei Abzug der durch chemische Hydrolyse gebildeten Pantoinsäure (Blank)

Tabelle 2: Reinigung der L-Pantolacton-Hydrolase aus Lu5351

Probe	Vol [L]	Aktivität [U/L]	Gesamtakt. [U]	Ausbeute Aktiv. [%]	Protein [g/L]	Gesamt- prot. [g]	Ausbeute Prot. [%]	Spez. Akt. [U/g Prot.]
Fermenter	28,0	2,0	56,8	-	-	-	-	-
vor Zellaufschluß	1,44	20,0	28,8	100,0	-	-	-	-
Zellaufschluß 1. Durchgang	1,44	5,5	7,9	27,5	-	-	-	-
Zellaufschluß 2. Durchgang	1,44	52,2	75,1	260,8	-	-	-	-
nach Zellaufschluß Suspension	1,86	57,3	106,6	370,3	-	-	-	9,9
nach Zellaufschluß Überstand	1,82	84,7	154,1	535,0	8,52	15,51	100,0	7,0
Überstand nach MnCl ₂	1,8	72,0	129,6	450,0	10,32	18,58	119,8	1,5
Auftrag Phenylsepharose	2,04	10,7	21,9	76,0	7,2	14,69	94,7	11,1
Wp Phenylseph.	0,16	87,0	13,9	48,3	7,82	1,251	8,1	231,9
WP Q-Sep.	0,12	83,5	10,0	34,8	0,36	0,043	0,3	-
Auftrag Superdex	0,012	605,0	7,3	25,2	-	-	-	78,0
Wp Superdex	0,04	41,3	1,7	5,7	0,53	0,021	0,1	-

Tab. 3a Substratspezifität der L-Pantolacton-Hydrolase aus Lu681

5	Substrat	Konzentration (mM)	Aktivität
	S-Pantolacton	150	++
	D-Pantolacton	150	-
	γ -Butyrolacton	150	+
10	γ -Valerolacton	150	+
	δ -Valerolacton	50	+
	ϵ -Caprolacton	150	++
	(+/-) δ -Decanolacton	15	-
15	δ -Nonalacton	75	+
	(+)-Ethyl-D-lactat	150	+
	(-)-Ethyl-L-lactat	150	++
	D-Galactono- γ -lactone	150	+
20	L-Galactono- γ -lactone	150	++
	L-(+)-Gulono- γ -lacton	150	+
	D-(-)-Gulono- γ -lacton	150	+
	1,2-O-Dilauryl-rac-glycero-3-glutar-säure-resorufinester	0,25	(+)
25	5-Hydroxy-2-cumaranon	2,5	+
	α -Naphthylacetat	2,5	(+)
	Isatin	10	+

30 ++: > 50 U/l
 +: > 5 U/l
 (+): > 0,5 U/l
 -: < 0,5 U/l

35

40

45

Tab. 3b Substratspezifität der L-Pantolacton-Hydrolase aus Lu5351

	Substrat	Konzentration (mM)	Aktivität
5	S-Pantolacton	150	++
	D-Pantolacton	150	(+)
	γ -Butyrolacton	150	++
10	γ -Valerolacton	150	++
	δ -Valerolacton	50	++
	ϵ -Caprolacton	150	++
	(+/-) δ -Decanolacton	15	++
15	δ -Nonalacton	75	++
	(+)-Ethyl-D-lactat	150	+
	(-)-Ethyl-L-lactat	150	++
	D-Galactono- γ -lactone	150	++
20	L-Galactono- γ -lactone	150	++
	L-(+)-Gulono- γ -lacton	150	++
	D-(-)-Gulono- γ -lacton	150	++
	1,2-O-Dilauryl-rac-glycero-3-glutar-säure-resorufinester	0,25	(+)
25	Dihydrocumarin	2,5	+
	α -Naphthylacetat	2,5	(+)
	Isatin	10	(+)

30 ++: > 50 U/l
 +: > 5 U/l
 (+): > 0,5 U/l
 -: < 0,5 U/l

35 Tab. 3c Lipaseaktivität der gereinigten L-Pantolacton-Hydrolase aus Lu681

	L-PL-Aktivität [U/l]	ΔE ($\lambda=572$)	Lipase-Aktivität [U/l]	Aktivität [%]
40	481,82	0,50	0,19	0,04
	240,91	0,40	0,15	0,06
	120,45	0,18	0,07	0,05
45	60,23	0,05	0,02	0,03

Tab. 4a Effekte verschiedener Substanzzusätze auf die Aktivität der L-Pantolacton-Hydrolase von *Burkholderia caryophylli* Lu681 im Standardassay

5

	Substanz	Konzentration [mM]	Relative Aktivität
	kein Zusatz	-	100%
	EDTA	1	97%
10	Citronensäure pH 6,4	30	97%
	o-Phenanthrolin	1	95%
	HgCl ₂	1	133%
	pCMBS	1	108%
15	DTT	1	99%
	PMSF	1	113%
	DIFP	1	115%
	Pepstatin	1	117%
20	H ₂ O ₂	1%	95%
	KCN	1	102%
	KCl	1	99%
	NH ₄ Cl	1	100%
	MgCl ₂	1	99%
25	CaCl ₂	1	101%
	MnCl ₂	1	100%
	CoCl ₂	1	97%
	FeCl ₂	1	104%
30	NiCl ₂	1	96%
	ZnCl ₂	1	113%
	SDS	1%	102%
	CHAPS	0,1%	104%
35	Triton	0,1%	104%
	Isopropanol	10%	93%
	Acetonitril	10%	119%
	MeOH	10%	100%

40

45

Tab. 4b Effekte verschiedener Substanzzusätze auf die Aktivität der L-Pantolacton-Hydrolase von *Agrobacterium radiobacter* Lu5351 im Standardassay

5	Substanz	Konzentration [mM]	Relative Aktivität
	kein Zusatz	-	100%
	EDTA	1	97%
	DIFP	1	92%
10	CHAPS	0,1%	100%
	SDS	1%	74%
	pCMBS	1	112%
	DTT	1	106%
15	HgCl ₂	1	170%
	FeCl ₂	1	108%
	ZnCl ₂	1	99%
	MgCl ₂	1	114%
20	CaCl ₂	1	105%

pCMBS = p-Chlormercurbiphenylsulfonsäure

DTT = Dithiothreitol

SDS = Sodiumdodecylsulfat

25 EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure

DIFP = Diisopropylfluorophosphat

CHAPS = ([3-Cholamidopropyl]-dimethylammonio)-1-propane-sulfonate

30

35

40

45

Tabelle 5: Homologien der L-Pantolacton-Hydrolase-Aminosäuresequenz aus Lu681 gemäß gap⁴- bzw. bestfit⁵-Recherche

Position im pKS+681- Insert (bp)	Aa	Homologon	Referenz/ Acc. No.	Organismus	Gap-Homo- logie (% aa)	Gap- Identität (% aa)	Bestfit- homologie (% aa)	Bestfit- Identität (% aa)
1498-2304	269	Isatin Hydrolase	W09119175	<i>Pseudomonas pu- tida</i>	47,9	37,4	48,1	37,6
		Hypothetisches Protein	B69206	<i>M. thermoauto- trophicum</i>	42,6	29,8	43,0	30,1
			D70817	<i>M. tuberculosis</i>	37,1	28,5	41,7	31,5
			B72430	<i>T. maritima</i>	45,4	31,9	45,9	32,2
			G69399	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	35,5	26,3	42,1	30,3
			S39964	<i>S. griseus</i>	39,6	29,8	42,0	32,1
			S75497	<i>Synechocystis sp.</i>	36,3	26,8	48,1	32,9
			T06135	<i>A. thaliana</i>	31,3	23,1	46,3	35,0
			T05418	<i>A. thaliana</i>	33,0	23,7	42,0	29,0
		Polyketide Synthase	O68500	<i>S. peuceticus</i>	42,7	32,6	46,6	37,5
		Tetracyclin Synthase	O86485	<i>S. argillaceus</i>	43,2	34,9	44,6	35,2
		ORF	Q54196	<i>S. griseus</i>	39,6	29,8	42,0	32,1

⁴ Needleman & Wunsch (1970), J. Mol. Biol. 48, 443-453

⁵ Smith & Waterman (1981), Adv. Appl. Math. 2, 482-489

Tabelle 6: Expression der L-Pantolacton-Hydrolase in E. coli XL1 Blue

a) XL1 Blue pKS+681 und pKS+ (Negativkontrolle)

Plasmid	Assaybedingungen	OD600 i.A.	Δ PS/mM 1h	A/U/l	ee-Wert (L-PS)
pKS+681	300 mM D, L-PL/1,1 M Tris/HCL pH 7,0	2,5	5,55	92,5	79,7
pKS+	300 mM D, L-PL/1,1 M Tris/HCL pH 7,0	2,5	0,21	3,5	n.d.
pKS+681	300 mM D, L-PL/1,1 M Tris/HCL pH 7,0, 1 % SDS	2,5	7,79	132,8	n.d.
pKS+	300 mM D, L-PL/1,1 M Tris/HCL pH 7,0, 1 % SDS	2,5	0,02	0	n.d.

b) XL1 Blue pKK681

Ansatz	Assaybedingungen	BTM i.A./ g/l	Δ PS/mM 1h	Δ PS/mM 3h	A/ U/l	ee-Wert (L-PS)
1	50 mM D, L-PL, 50 mM Tris/HCL pH 7,0	8,6	n.b.	5,2	28	95,3
2	150 mM L-PL, 150 mM Pipes pH 7,0	8,6	46	46	760	(-)
3	300 mM D, L-PL, 50 mM Tris/HCL pH 6,8, Titration mit 4M NaOH	1,7	5,6	16,5	92	91,3

n.b., nicht bestimmt

Tab. 7a

5	Aufarbeitung D-Pantolacton	
	Ausbeute gesamt	69,00 %
	Reinheit (GC-MS)	> 98,00 %
	Reinheit (H-NMR)	> 95,00 %
	Wassergehalt	< 0,40 %

10

Tab. 7b

15	Aufarbeitung L-Pantolacton	
	Ausbeute gesamt	85,00 %
	Reinheit (GC-MS) *	> 95,00 %
	Reinheit (H-NMR)	> 97,00 %
	Wassergehalt	< 0,40 %

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit L-Pantolacton-Hydrolaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist
- d) funktionelle Äquivalente der unter (a) bis (c) genannten Sequenzen.
2. Aminosäuresequenz codiert durch eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1.
3. Aminosäuresequenz nach Anspruch 2, codiert durch die in SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz.
4. Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1, wobei die Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen verknüpft ist.
5. Vektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4.
6. Mikroorganismus enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1, mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4 oder einen Vector gemäß Anspruch 5.

7. Mikroorganismus nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Mikroorganismus um ein gram-negatives Bakterium handelt.
- 5 8. Mikroorganismus nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Mikroorganismus um ein Bakterium aus der Gruppe der α -Proteobakterien, β -Proteobakterien oder γ -Proteobakterien handelt.
- 10 9. Mikroorganismus nach den Ansprüchen 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Mikroorganismus um ein Bakterium aus der Familie der Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae oder Rhizobiaceae handelt.
- 15 10. Mikroorganismus nach den Ansprüchen 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Mikroorganismus um ein Bakterium der Gattungen Agrobacterium, Pseudomonas, Burkholderia, Salmonella oder Escherichia handelt.
- 20 11. L-Pantolacton-Hydrolase, gekennzeichnet durch die folgenden Eigenschaften:
- a) Umsetzung von L-Pantolacton zur entsprechenden Säure,
 - 25 b) pH-Stabilität: L-Pantolacton-Hydrolase ist stabil in einem pH-Bereich von 4 bis 10
 - c) pH-Optimum: 7,2 bis 7,6
 - 30 d) Temperaturoptimum: ca. 70°C bis 75°C
 - e) keine Hemmung der Aktivität durch EDTA
12. Verfahren zur Herstellung von D-Pantolacton, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren folgende Reaktionsschritte umfaßt:
- 35
- a) Umsetzung racemischen Pantolactons in Gegenwart einer L-Pantolacton-Hydrolase gemäß Anspruch 11 oder einer
 - 40 L-Pantolacton-Hydrolase mit einer Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 2 oder einem Mikroorganismus gemäß Anspruch 6 zu D-Pantolacton und L-Pantoinsäure
 - b) Abtrennung des D-Pantolactons.
- 45

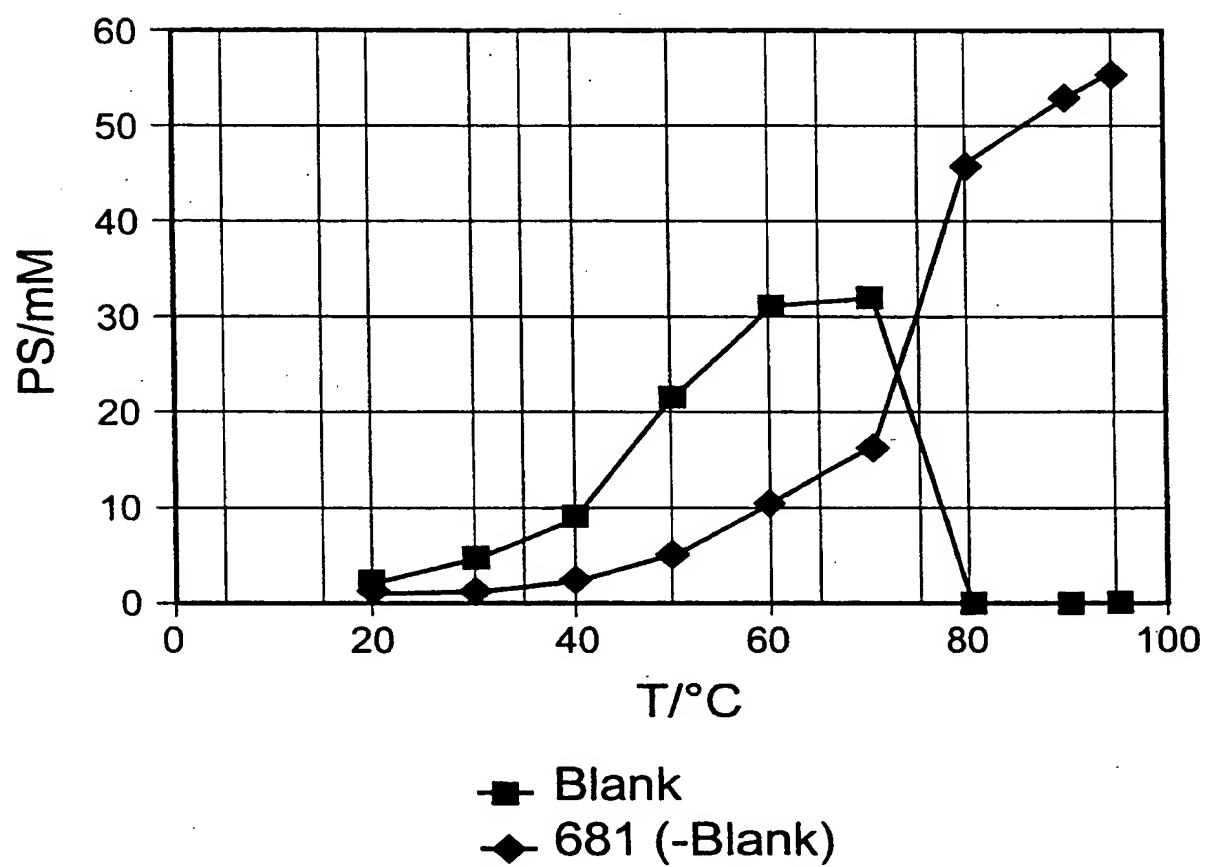
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die unter Reaktionsschritt (b) erhaltene L-Pantoinsäure racemisiert und in Reaktionsschritt (a) rückgeführt wird.
- 5 14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung des racemischen Pantolactons in Gegenwart einer immobilisierten L-Pantolacton-Hydrolase gemäß Anspruch 11 oder einer immobilisierten L-Pantolactonhydrolase mit einer Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 2 durchgeführt wird.
- 10 15. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung des racemischen Pantolactons in Gegenwart eines wachsenden, ruhenden oder aufgeschlossenen Mikroorganismus gemäß Anspruch 6 durchgeführt wird.
- 15 16. Verfahren nach Anspruch 12 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Mikroorganismus immobilisiert ist.
- 20 17. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren in wäßriger Reaktionslösung bei einem pH zwischen 4 bis 12 durchgeführt wird.
- 25 18. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren bei einer Temperatur zwischen 0°C bis 95°C durchgeführt wird.
19. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß das D-Pantolacton über Extraktion abgetrennt wird.
- 30 20. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß das D-Pantolacton eine optische Reinheit von mindestens 90 % ee besitzt.

35

40

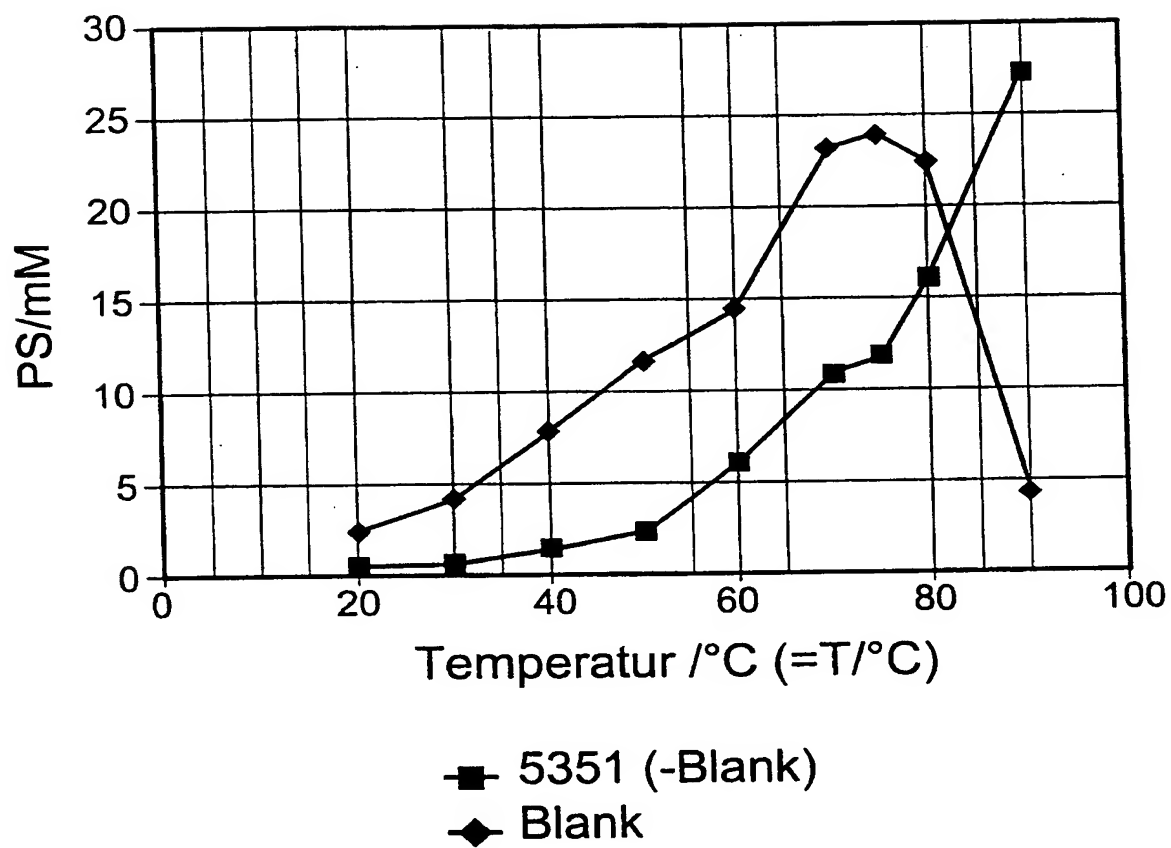
45

FIG.1A



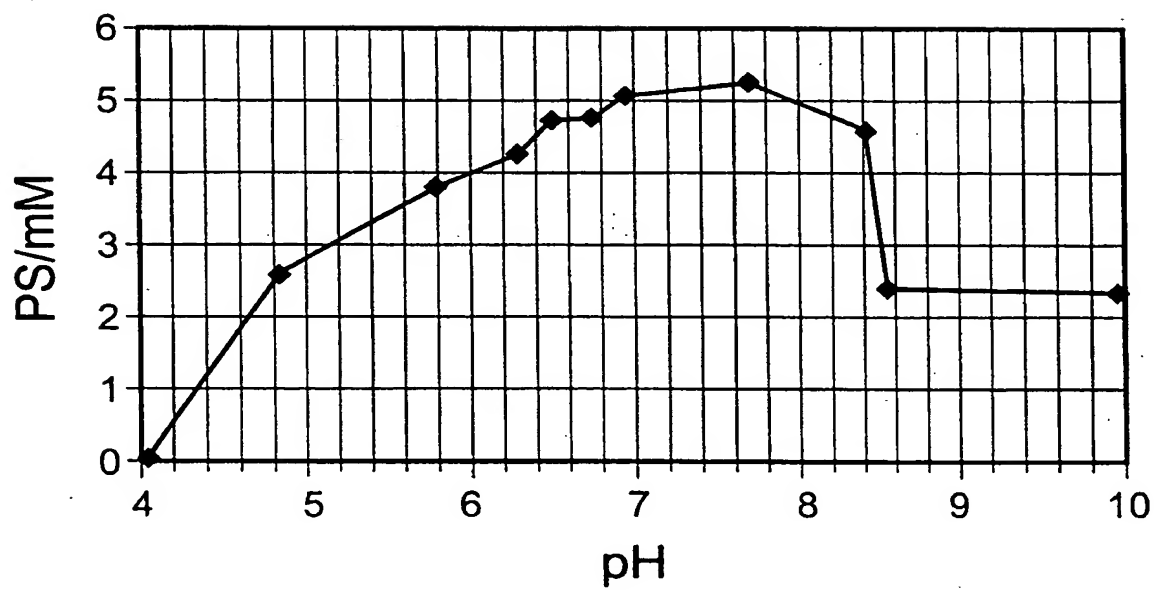
2/11

FIG.1B



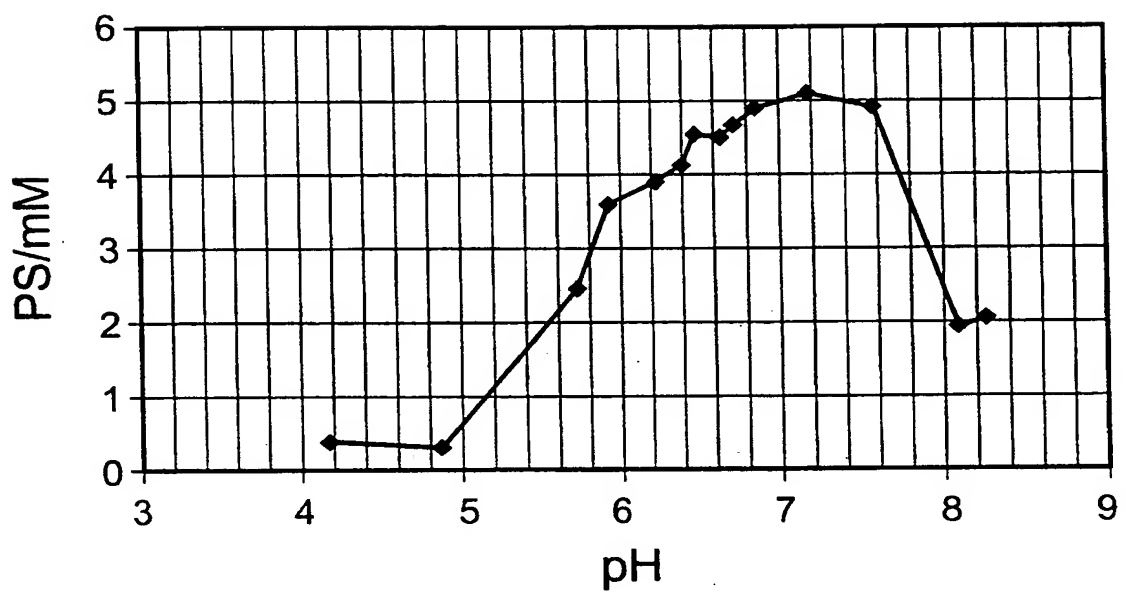
3/11

FIG.2A



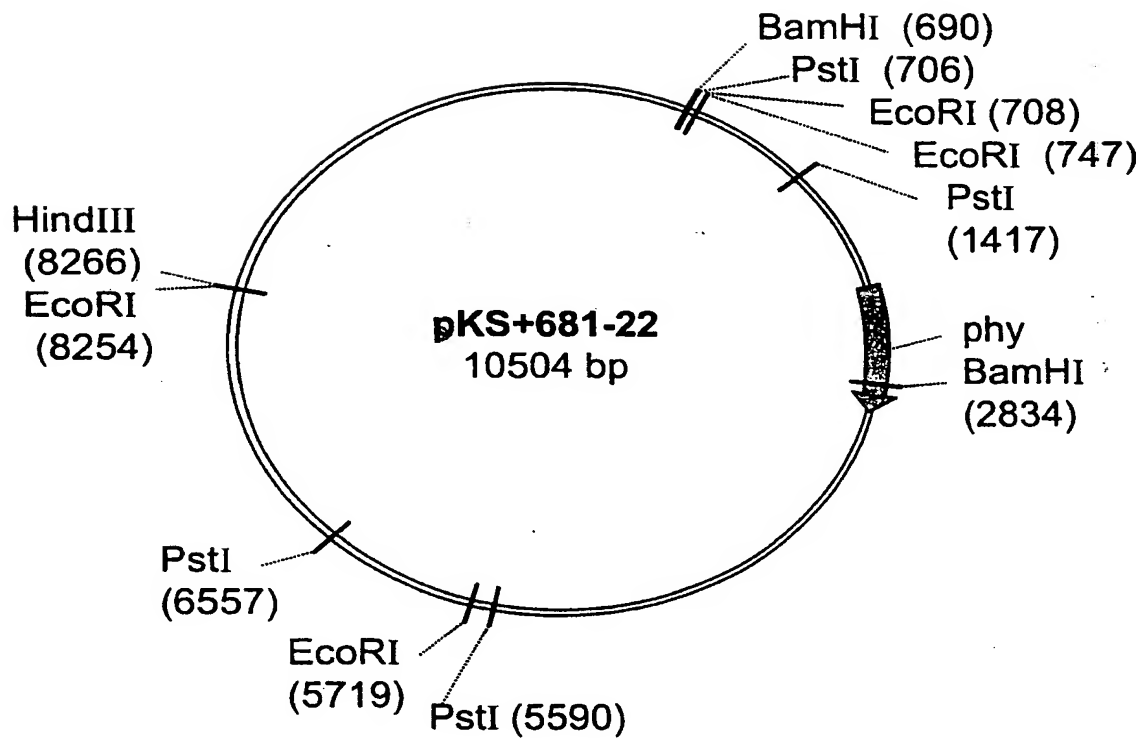
4/11

FIG.2B



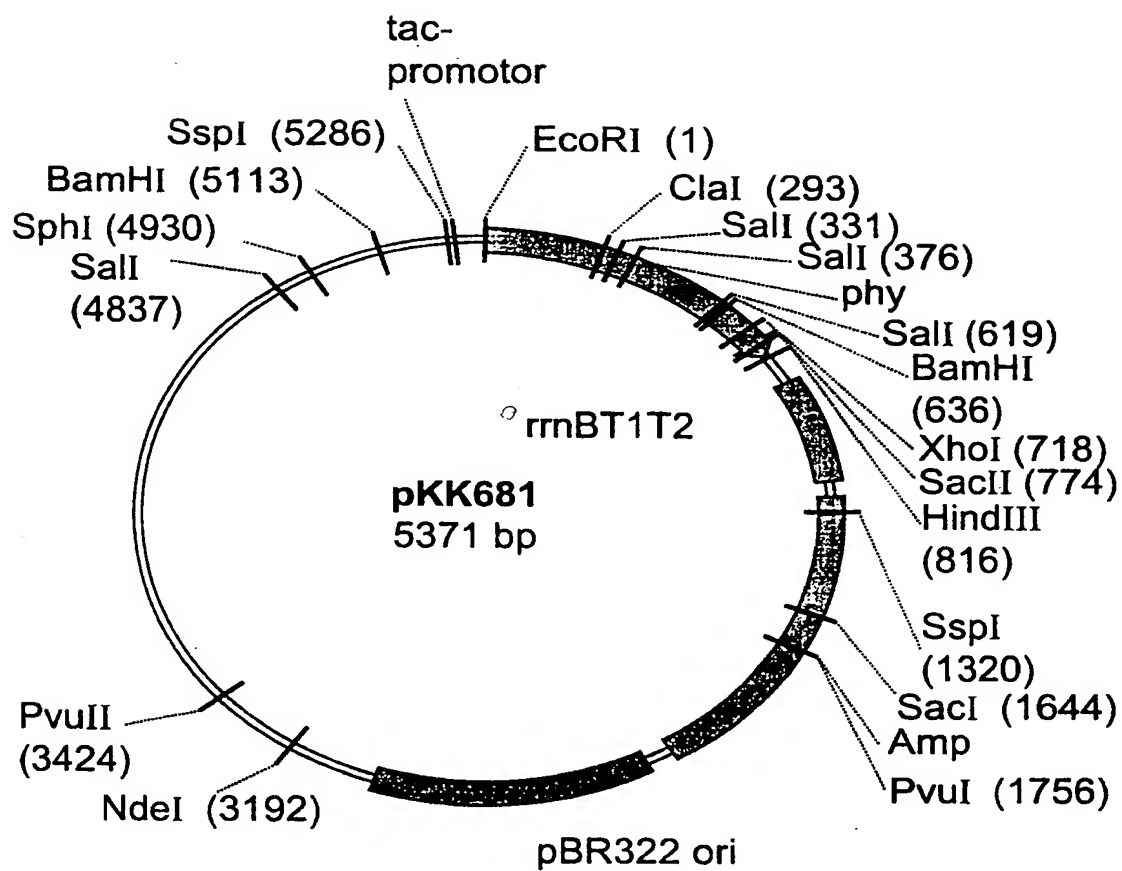
5/11

FIG.3



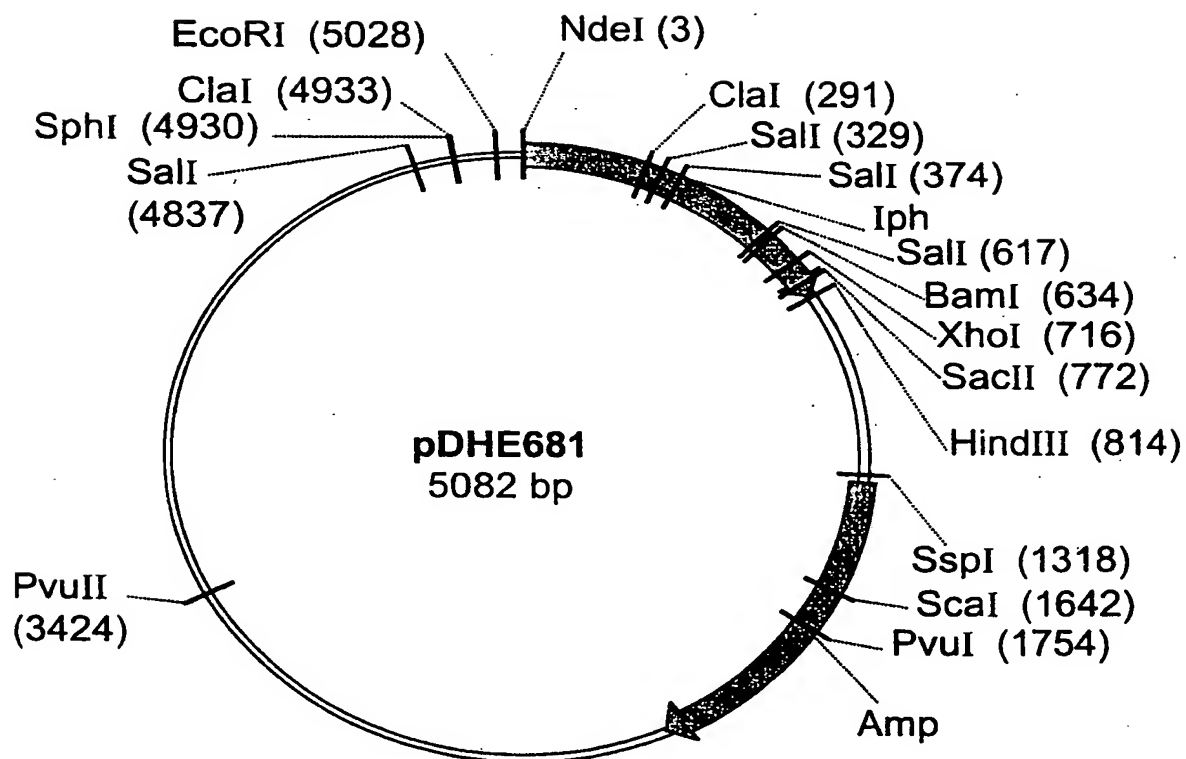
6/11

FIG.4



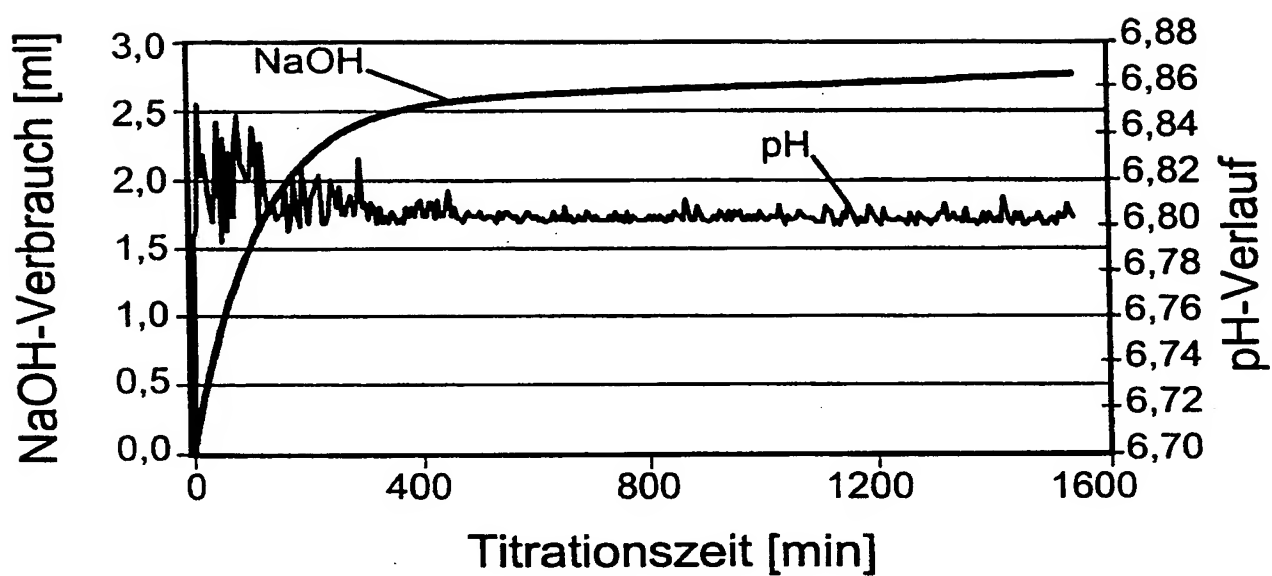
7/11

FIG.5



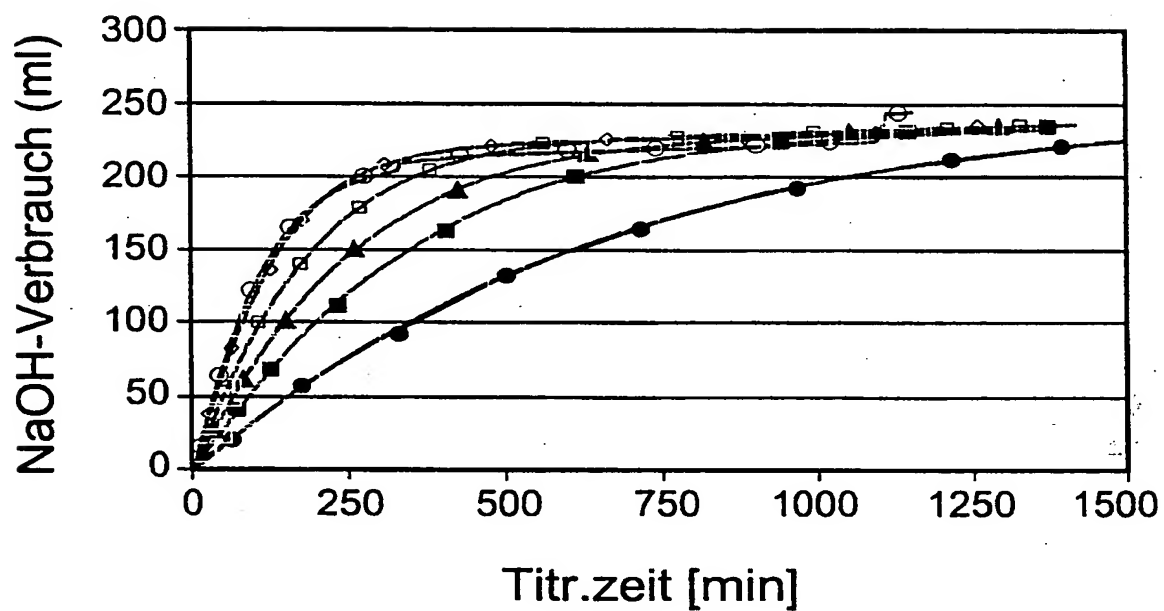
8/11

FIG.6



9/11

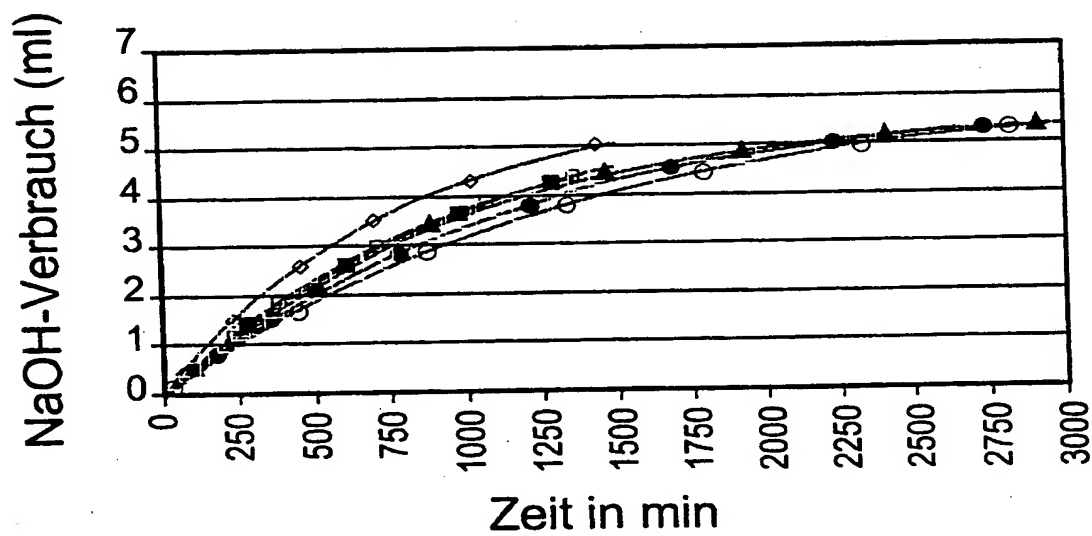
FIG.7



- 1.d 52,2 % U, 94,9 % ee bei 1180'
- ◇- 2.d 52,5 % U, 94,3 % ee bei 1170'
- 3.d 52,7 % U, 94,2 % ee bei 1420'
- ▲- 4.d 51,1 % U, 94,5 % ee bei 1200'
- 5.d 50,7 % U, 92,4 % ee bei 1232'
- 7.d *

10/11

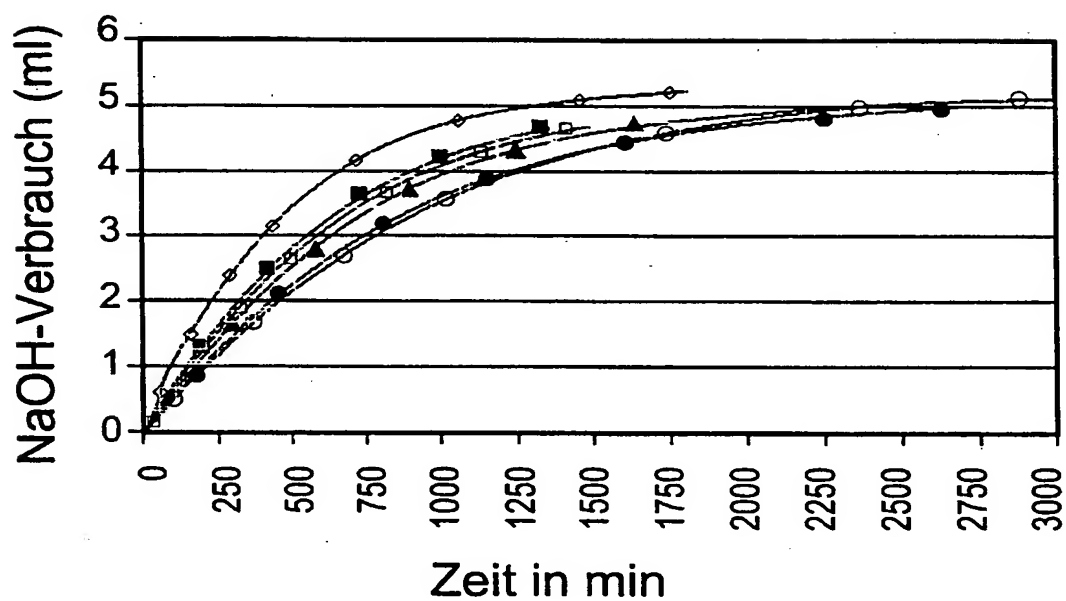
FIG.8



- ◇— 1. 53,4 % U, 87,4 % ee bei 1800'
- 2. 53,0 % U, 89,1 % ee bei 2400'
- 3. 55,4 % U, 90,3 % ee bei 2700'
- ▲— 4. 54,5 % U, 91,3 % ee bei 3030'
- 5. 54,2 % U, 86,3 % ee bei 2655'
- 6. 58,7 % U, 88,3 % ee bei 3600'

11/11

FIG.9



- 1. 49,4 % U, 90,1 % ee bei 1500'
- 2. 51,2 % U, 92,6 % ee bei 2040'
- 3. 51,9 % U, 92,6 % ee bei 2400'
- 4. 50,9 % U, 90,6 % ee bei 2400'
- 5. 50,7 % U, 87,8 % ee bei 2655'
- 6. 53,1 % U, 90,1 % ee bei 3000'

1

SEQUENZPROTOKOLL

<211> 810

<212> DNA

<213> Burkholderia caryophylli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(810)

<223> Lu681

<400> 1

atg tgc aac aac tgc gtg atc gag aac gta aaa aag aac atg ctt tca	48
Met Cys Asn Asn Cys Val Ile Glu Asn Val Lys Lys Asn Met Leu Ser	
1 5 10 15	
cgg cgc ctg ctg ttc aag ggc gct gcg gca ggt ttg acg gcc atg acg	96
Arg Arg Leu Leu Phe Lys Gly Ala Ala Ala Gly Leu Thr Ala Met Thr	
20 25 30	
gca ggc agt ctg gct tcc ccg gcg ctt gcg caa tcg ccc cgg cag gtc	144
Ala Gly Ser Leu Ala Ser Pro Ala Leu Ala Gln Ser Pro Arg Gln Val	
35 40 45	
gtt gat ctc act cac acc tat gat tcc gca ttt ccc acc ttc gat ggc	192
Val Asp Leu Thr His Thr Tyr Asp Ser Ala Phe Pro Thr Phe Asp Gly	
50 55 60	
aaa ccg ggc ata gaa tat gag tgg gca gcg cag atc gcc aaa gac ggc	240
Lys Pro Gly Ile Glu Tyr Glu Trp Ala Ala Gln Ile Ala Lys Asp Gly	
65 70 75 80	
tat cag ctc cgc aaa ctc acc atc tac gaa cat acc ggc acc cat atc	288
Tyr Gln Leu Arg Lys Leu Thr Ile Tyr Glu His Thr Gly Thr His Ile	
85 90 95	
gat gcg cct ttc cac ttc agc gcc gat ggc gcg agc gtc gac caa ctg	336
Asp Ala Pro Phe His Phe Ser Ala Asp Gly Ala Ser Val Asp Gln Leu	
100 105 110	
gag ccg cag aaa ctt gtc gct ccg ctt gtc atc gtc gac atc acc gag	384
Glu Pro Gln Lys Leu Val Ala Pro Leu Val Ile Val Asp Ile Thr Glu	
115 120 125	
cgc gcc aaa gag gat gcc aat tcc acc att gaa gcc gaa gac atc gag	432
Arg Ala Lys Glu Asp Ala Asn Ser Thr Ile Glu Ala Glu Asp Ile Glu	
130 135 140	
cgc tgg ata tct gcg aat ggc gac atc ccg aca ggt gca atc gtg gct	480
Arg Trp Ile Ser Ala Asn Gly Asp Ile Pro Thr Gly Ala Ile Val Ala	
145 150 155 160	

2

tta cgc tcc gga tgg gca acc aaa gtg aag agt ccc tca ttc cgc aat 528
 Leu Arg Ser Gly Trp Ala Thr Lys Val Lys Ser Pro Ser Phe Arg Asn
 165 170 175

gac gaa gcc gga caa ttc gcc ttc ccc ggt ttc ggc aaa tcg gcg acc 576
 Asp Glu Ala Gly Gln Phe Ala Phe Pro Gly Phe Gly Lys Ser Ala Thr
 180 185 190

gac ctt ctg ctg aag ctc gac acc gtc gcc att ggc gtc gac aca ctt 624
 Asp Leu Leu Leu Lys Leu Asp Thr Val Ala Ile Gly Val Asp Thr Leu
 195 200 205

tct ctg gat ccg ggc aac tcc gca gat ttc gcg gtt cac aat tcc tgg 672
 Ser Leu Asp Pro Gly Asn Ser Ala Asp Phe Ala Val His Asn Ser Trp
 210 215 220

ctg cca gca gga cgc tac ggt atc gaa gga ctg aac aac ctc gag gct 720
 Leu Pro Ala Gly Arg Tyr Gly Ile Glu Gly Leu Asn Asn Leu Glu Ala
 225 230 235 240

ctg ccg gtc aag gga gcg acc ata atc gtc ggc gcg ccg gca cac cgc 768
 Leu Pro Val Lys Gly Ala Thr Ile Ile Val Gly Ala Pro Ala His Arg
 245 250 255

ggc gga acg ggc ggc cca gcc cgt att ctg gcc ctg gtc tga 810
 Gly Gly Thr Gly Gly Pro Ala Arg Ile Leu Ala Leu Val
 260 265 270

<210> 2

<211> 269

<212> PRT

<213> Burkholderia caryophylli

<400> 2

Met Cys Asn Asn Cys Val Ile Glu Asn Val Lys Lys Asn Met Leu Ser
 1 5 10 15

Arg Arg Leu Leu Phe Lys Gly Ala Ala Ala Gly Leu Thr Ala Met Thr
 20 25 30

Ala Gly Ser Leu Ala Ser Pro Ala Leu Ala Gln Ser Pro Arg Gln Val
 35 40 45

Val Asp Leu Thr His Thr Tyr Asp Ser Ala Phe Pro Thr Phe Asp Gly
 50 55 60

Lys Pro Gly Ile Glu Tyr Glu Trp Ala Ala Gln Ile Ala Lys Asp Gly
 65 70 75 80

Tyr Gln Leu Arg Lys Leu Thr Ile Tyr Glu His Thr Gly Thr His Ile

Asp Ala Pro Phe His Phe Ser Ala Asp Gly Ala Ser Val Asp Gln Leu
 100 105 110

Glu Pro Gln Lys Leu Val Ala Pro Leu Val Ile Val Asp Ile Thr Glu
 115 120 125

Arg Ala Lys Glu Asp Ala Asn Ser Thr Ile Glu Ala Glu Asp Ile Glu
 130 135 140

Arg Trp Ile Ser Ala Asn Gly Asp Ile Pro Thr Gly Ala Ile Val Ala
 145 150 155 160

Leu Arg Ser Gly Trp Ala Thr Lys Val Lys Ser Pro Ser Phe Arg Asn
 165 170 175

Asp Glu Ala Gly Gln Phe Ala Phe Pro Gly Phe Gly Lys Ser Ala Thr
 180 185 190

Asp Leu Leu Leu Lys Leu Asp Thr Val Ala Ile Gly Val Asp Thr Leu
 195 200 205

Ser Leu Asp Pro Gly Asn Ser Ala Asp Phe Ala Val His Asn Ser Trp
 210 215 220

Leu Pro Ala Gly Arg Tyr Gly Ile Glu Gly Leu Asn Asn Leu Glu Ala
 225 230 235 240

Leu Pro Val Lys Gly Ala Thr Ile Ile Val Gly Ala Pro Ala His Arg
 245 250 255

Gly Gly Thr Gly Gly Pro Ala Arg Ile Leu Ala Leu Val
 260 265

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Burkholderia caryophylli

<400> 3

Tyr Gly Ile Glu Gly Leu Asn Asn Leu Glu Ala Leu
 1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Burkholderia caryophylli

<400> 4

Ala Lys Glu Asp Ala Asn Ser Thr Ile Glu Ala Glu Asp

1

5

10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Burkholderia caryophylli

<400> 5

Tyr Leu Gly Ile Glu Gly Leu Asn Asn Leu Glu Ala Leu

1

5

10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Burkholderia caryophylli

<400> 6

Ala Lys Glu Asp Ala Val Ser Thr Ile Glu

1

5

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/EP 00/10320

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/55 C12N9/18
//(C12N1/21, C12R1:19)

C12N1/21

C12P17/04

C12P41/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C12P C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND, BIOSIS, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category * Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages

Relevant to claim No.

A

DATABASE WPI
Section Ch, Week 198029
Derwent Publications Ltd., London, GB;
Class B03, AN 1980-50524C
XP002161908
& JP 55 072182 A (SAGAMI CHEM RES CENTRE),
30 May 1980 (1980-05-30)
abstract

A

DATABASE WPI
Section Ch, Week 198805
Derwent Publications Ltd., London, GB;
Class B03, AN 1988-033627
XP002161909
& JP 62 294096 A (MITSUBISHI CHEM IND LTD)
, 21 December 1987 (1987-12-21)
cited in the application
abstract

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 March 2001

Date of mailing of the international search report

13/03/2001

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ional Application No

PCT/EP 00/10320

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 198805 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B03, AN 1988-033625 XP002161910 & JP 62 294092 A (MITSUBISHI CHEM IND LTD) , 21 December 1987 (1987-12-21) cited in the application abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>KOBAYASHI M ET AL: "Lactone-ring-cleaving enzyme: genetic analysis, novel RNA editing, and evolutionary implications" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, vol. 95, no. 22, 27 October 1998 (1998-10-27), pages 12787-12792, XP002134265 ISSN: 0027-8424 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>EP 0 794 251 A (FUJI YAKUHHIN KOGYO KK) 10 September 1997 (1997-09-10) cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>EP 0 504 421 A (FUJI YAKUHHIN KOGYO KK) 23 September 1992 (1992-09-23) the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
P,A	<p>WO 00 28043 A (NOVO NORDISK BIOTECH INC) 18 May 2000 (2000-05-18) the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/10320

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 55072182	A	30-05-1980	NONE	
JP 62294096	A	21-12-1987	JP 1928402 C JP 6055156 B	12-05-1995 27-07-1994
JP 62294092	A	21-12-1987	JP 1941253 C JP 6067320 B	23-06-1995 31-08-1994
EP 0794251	A	10-09-1997	AU 1810197 A CA 2204743 A CN 1166182 A HU 9701904 A WO 9710341 A	01-04-1997 20-03-1997 26-11-1997 02-03-1998 20-03-1997
EP 0504421	A	23-09-1992	JP 3011449 B JP 4144681 A DE 69121080 D DE 69121080 T DE 504421 T US 5372940 A AU 639376 B AU 8625991 A CA 2070640 A WO 9206182 A	21-02-2000 19-05-1992 29-08-1996 30-01-1997 19-05-1993 13-12-1994 22-07-1993 28-04-1992 06-04-1992 16-04-1992
WO 0028043	A	18-05-2000	AU 1909900 A	29-05-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/10320

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/55 C12N9/18 C12N1/21 C12P17/04 C12P41/00
 //(C12N1/21, C12R1:19)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P C12R

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND, BIOSIS, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 198029 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B03, AN 1980-50524C XP002161908 & JP 55 072182 A (SAGAMI CHEM RES CENTRE), 30. Mai 1980 (1980-05-30) Zusammenfassung</p>	
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 198805 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B03, AN 1988-033627 XP002161909 & JP 62 294096 A (MITSUBISHI CHEM IND LTD) , 21. Dezember 1987 (1987-12-21) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung</p>	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. März 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13/03/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 198805 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B03, AN 1988-033625 XP002161910 & JP 62 294092 A (MITSUBISHI CHEM IND LTD) , 21. Dezember 1987 (1987-12-21) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung</p>	
A	<p>KOBAYASHI M ET AL: "Lactone-ring-cleaving enzyme: genetic analysis, novel RNA editing, and evolutionary implications" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, Bd. 95, Nr. 22, 27. Oktober 1998 (1998-10-27), Seiten 12787-12792, XP002134265 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument</p>	
A	<p>EP 0 794 251 A (FUJI YAKUHHIN KOGYO KK) 10. September 1997 (1997-09-10) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	
A	<p>EP 0 504 421 A (FUJI YAKUHHIN KOGYO KK) 23. September 1992 (1992-09-23) das ganze Dokument</p>	
P,A	<p>WO 00 28043 A (NOVO NORDISK BIOTECH INC) 18. Mai 2000 (2000-05-18) das ganze Dokument</p>	

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/10320

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 55072182 A	30-05-1980	KEINE	
JP 62294096 A	21-12-1987	JP 1928402 C JP 6055156 B	12-05-1995 27-07-1994
JP 62294092 A	21-12-1987	JP 1941253 C JP 6067320 B	23-06-1995 31-08-1994
EP 0794251 A	10-09-1997	AU 1810197 A CA 2204743 A CN 1166182 A HU 9701904 A WO 9710341 A	01-04-1997 20-03-1997 26-11-1997 02-03-1998 20-03-1997
EP 0504421 A	23-09-1992	JP 3011449 B JP 4144681 A DE 69121080 D DE 69121080 T DE 504421 T US 5372940 A AU 639376 B AU 8625991 A CA 2070640 A WO 9206182 A	21-02-2000 19-05-1992 29-08-1996 30-01-1997 19-05-1993 13-12-1994 22-07-1993 28-04-1992 06-04-1992 16-04-1992
WO 0028043 A	18-05-2000	AU 1909900 A	29-05-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKÉWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)